



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**Evaluación de los parámetros de tiempo y temperatura
para el crecimiento de *Giardia lamblia* en medio de
cultivo TYI-S-33 comercial y artesanal**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga
Parasitóloga

AUTOR

Giovanna Thaliz RAMÍREZ CARRANZA

ASESOR

Mg. Rosa Nériida MARTÍNEZ ROJAS

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Ramírez, G. (2019). *Evaluación de los parámetros de tiempo y temperatura para el crecimiento de Giardia lamblia en medio de cultivo TYI-S-33 comercial y artesanal*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 16:00 horas del 05 de abril de 2019, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga de **GIOVANNA THALIZ RAMÍREZ CARRANZA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 021-EPMP-2018, la titulando expuso su tesis: **“EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE TIEMPO Y TEMPERATURA PARA EL CRECIMIENTO DE *Giardia lamblia* EN MEDIO DE CULTIVO TYI-S-33 COMERCIAL Y ARTESANAL”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19....., calificativo: Aprobado con máximos honores

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga a **GIOVANNA THALIZ RAMÍREZ CARRANZA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 17:10 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 05 de abril de 2019.

Dra. EGMA MAYTA HUATUCO
(PRESIDENTA)

Mg. ROSA MARTINEZ ROJAS
(ASESORA)

Mg. FERNANDO MERINO RAFAEL
(MIEMBRO)

Mg. RUTH GARCIA DE LA GUARDA
(MIEMBRO)

A mis padres y hermano

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento a la MSc. Blga. Kathia Tarqui Terrones, por confiar en mí y darme la oportunidad de desarrollar este gran proyecto que es mi tesis, gracias por la asesoría y toda la enseñanza brindada; a la Blga. María Beltrán Fabián por haberme acogido en el laboratorio de Enteroparásitos, del Centro Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud y por compartirme sus conocimientos y experiencias en parásitos intestinales; a la sra. María Espinoza, a la técnica Sara Torrealva, al Blgo Juan Ramírez y a la Blga. Iris Silva, equipo de trabajo del laboratorio de Enteroparásitos, por el apoyo incondicional brindado hacia mi persona, muchas gracias a cada uno de ustedes.

A la Mg. Rosa Martínez Rojas por haber aceptado ser mi asesora de tesis y por su orientación durante el desarrollo de la misma, muchas gracias profesora Rosa.

Un agradecimiento especial a mis padres Miguel y Giovanna, y a mi hermano Néstor por su apoyo incondicional, por siempre estar junto a mí, definitivamente fueron el pilar que me mantuvo de pie, los amo. A Luis Angel, mi gran motivación, gracias por cada palabra de aliento y nunca dejar que me rinda.

Gracias a todos los integrantes del Laboratorio BTS, Laboratorio IRAS y Laboratorio IIH del Instituto Nacional de Salud por permitirme usar sus equipos e instalaciones.

Quedan cortas las líneas para poder agradecer a las personas que formaron parte de este proceso, solo me queda decir gracias a todos por sus consejos.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	9
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	10
4.1. Material biológico	10
4.2. Preparación de medio de cultivo	10
4.2.1 Medio de cultivo TYI-S-33 comercial	10
4.2.2 Medio de cultivo TYI-S-33 artesanal	11
4.3. Reactivación de la cepa de <i>Giardia intestinalis</i> (<i>G. lamblia</i>)	12
4.4. Preparación de antimicrobianos a diferentes concentraciones	14
4.5. Curva de crecimiento	15
V. RESULTADOS	18
VI. DISCUSIÓN	39
VII. CONCLUSIONES	43
VIII. RECOMENDACIONES	44
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
X. ANEXOS	50

TABLAS

	Pág.
Tabla 1 Carga, viabilidad y deformidad de <i>Giardia lamblia</i> en medio de cultivo TYI-S-33 comercial y artesanal	20
Tabla 2 Prueba de ANOVA para la carga parasitaria	22
Tabla 3 Prueba de ANOVA para la viabilidad parasitaria	22
Tabla 4 Prueba de ANOVA para la deformidad parasitaria	23
Tabla 5 Concentración de antibióticos	23
Tabla 6 Carga parasitaria de <i>Giardia lamblia</i> en medio de cultivo TYI-S-33 artesanal a 36°C, 36.5°C y 37°C	28
Tabla 7 Carga parasitaria promedio de <i>Giardia lamblia</i> en medio TYI-S-33 artesanal y comercial a 36°C, 36.5°C y 37°C	28
Tabla 8 Viabilidad de <i>Giardia lamblia</i> en medio TYI-S-33 comercial a 36°C, 36.5°C y 37°C	31
Tabla 9 Viabilidad de <i>Giardia lamblia</i> en medio TYI-S-33 artesanal a 36°C, 36.5°C y 37°C	32
Tabla 10 Prueba de TUKEY para las temperaturas en medio TYI-S-33 artesanal	34
Tabla 11 Prueba de TUKEY para las temperaturas en medio TYI-S-33 comercial	35
Tabla 12 Prueba de ANOVA para la carga parasitaria en medio TYI-S-33 artesanal y TYI-S-33 comercial a 37°C	36

FIGURAS

	Pág.
Figura 1 Quistes de <i>Giardia lamblia</i> en lugol.	4
Figura 2 Trofozoitos de <i>Giardia lamblia</i> .	5
Figura 3 Cepa de <i>Giardia intestinalis</i> ATCC 30957 (<i>G. lamblia</i>)	10
Figura 4 Medio TYI-S-33 artesanal dispensado en tubos 13x100 mm	12
Figura 5 Reactivación de cepa ATCC 30957 en medio comercial TYI-S-33	13
Figura 6 Medios de cultivo en baño de frío 4°C por 10 min	14
Figura 7 Medios de cultivo centrifugados a 2300 rpm por 5 minutos	15
Figura 8 Conteo de trofozoitos en cámara de Neubauer	16
Figura 9 Flujograma de trabajo	17
Figura 10 Trofozoitos de <i>Giardia lamblia</i> reactivados en medio TYI-S-33 comercial	19
Figura 11 Cultivo de <i>Giardia lamblia</i> con contaminación bacteriana	25
Figura 12 Cultivo de <i>Giardia lamblia</i> con antibióticos seleccionados	26
Figura 13 Cultivo de <i>Giardia lamblia</i> con precipitado azul	26
Figura 14 Cultivo de <i>Giardia lamblia</i> con precipitado azul y deformidad de trofozoitos	27
Figura 15 Curva de crecimiento en medio TYI-S-33 comercial a 36°C, 36.5°C y 37°C	29
Figura 16 Curva de crecimiento en medio TYI-S-33 artesanal a 36°C, 36.5°C y 37°C	29

Figura 17	Fases de la curva de crecimiento en medio TYI-S-33 artesanal a 37°C	31
Figura 18	Curva de viabilidad de <i>Giardia lamblia</i> en medio TYI-S-33 comercial a 36°C, 36.5°C y 37°C	32
Figura 19	Curva de viabilidad de <i>Giardia lamblia</i> en medio TYI-S-33 artesanal a 36°C, 36.5°C y 37°C	33
Figura 20	Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	51

RESUMEN

Giardia lamblia es el protozoo más común en el humano, encontrado con mayor frecuencia en exámenes coprológicos (Vásquez y Campos, 2009), afectando principalmente a niños causando efectos negativos en el estado nutricional y desarrollo (Rodríguez, 2012). El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los parámetros de tiempo, temperatura y concentración de antimicrobianos para el crecimiento de *Giardia lamblia* en medio de cultivo TYI-S-33 comercial y artesanal. Se llevó a cabo en el Laboratorio de Enteroparásitos de la DEET, del Centro Nacional de Salud Pública del Instituto Nacional de Salud. Se trabajó con la cepa de *Giardia intestinalis* ATCC 30957 criopreservada a -70°C procedente de un aspirado duodenal de un paciente varón y se reactivó en medio TYI-S-33 comercial, las resiembras se realizaron en medio TYI-S-33 comercial y artesanal, que contenían los antibióticos: penicilina (394 U/ml), estreptomicina (394 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y amikacina (156 µg/ml), para comparar la carga parasitaria en cada uno de ellos y determinar el mejor medio de cultivo para su desarrollo. Así mismo, se determinó la curva de crecimiento durante 216 horas a tres temperaturas distintas (36°C, 36.5°C y 37°C) determinándose que *Giardia lamblia* tiene un mejor crecimiento en medio de cultivo TYI-S-33 artesanal a 37°C y una fase log entre las 72 a 120 horas.

Palabras clave: *Giardia lamblia*, protozoa, medioTYI-S-33, amikacina, examen coprológico, carga parasitaria, curva de crecimiento.

ABSTRACT

Giardia lamblia is the most common protozoon in humans, found most frequently in coprological examinations (Vásquez and Campos, 2009), mainly affecting children, causing negative effects on nutritional status and development (Rodriguez, 2012). The objective of this study was to evaluate the parameters time, temperature and concentration of antimicrobials for the growth of *Giardia lamblia* in commercial and artisanal TYI-S-33 culture medium and it was carried out in the Enteroparasites Laboratory of the DEET, of the National Health Center Public of the National Institute of Health. We worked with the cryopreserved strain of *Giardia intestinalis* ATCC 30957 at -70 ° C from a duodenal aspirate of a male patient and was reactivated in commercial TYI-S-33 medium, reseeding was carried out in commercial TYI-S-33 medium and artisanal, containing antibiotics: penicillin (394 U/ml), streptomycin (394 µg/ml), gentamicin (50 µg/ml) and amikacin (156 µg/ml), to compare the parasitic load in each of them and determine the best culture medium for its development. Likewise, the growth curve was determined during 216 hours at three different temperatures (36 ° C, 36.5 ° C and 37 ° C), determining that *Giardia lamblia* has a better growth in artisan culture medium TYI-S-33 at 37 ° C and a log phase between 72 to 120 hours.

Key words: *Giardia lamblia*, protozoa, mediumTYI-S-33, amikacin, coprological examination, parasitic load, growth curve.

I. INTRODUCCIÓN

Giardia sp. es un protozoo flagelado que infecta a un amplio rango de hospederos vertebrados, entre ellos los humanos, causándole la enfermedad llamada giardiasis. Esta parasitosis es una de las principales causas de gastroenteritis a nivel mundial que puede causar diarreas disentéricas, considerada así como una enfermedad infecciosa reemergente, desatendida, siendo un problema de salud pública (Torres *et al.*, 2011).

Afecta en su mayoría a los niños, reportándose cerca de 280 millones de casos sintomáticos por año. Los síntomas característicos son diarrea acuosa, dolor epigástrico, síndrome de mala absorción, náuseas, vómito y pérdida de peso, signos que suelen aparecer después de 6 a 15 días de contraído el parásito (Hernández *et al.*, 2012), siendo un factor de riesgo en niños de 0 a 5 años de edad (Lucero *et al.*, 2015) pudiendo causar deficiencia en el aprendizaje y función cognitiva (Marcos *et al.*, 2000).

Tiene una distribución global que causa aproximadamente 2.8×10^8 casos de giardiasis por año. En Asia, África y América Latina, alrededor de 200 millones de personas padecen de esta enfermedad sintomática, con aproximadamente 500,000 nuevos casos reportados cada año (Thompson, 2004).

Núñez *et al.* (2003), consideran a este parásito como el principal agente patógeno presente en los brotes de transmisión hídrica ocurrido en países desarrollados como Inglaterra y los Estados Unidos, calculando en este último un aproximado de 5.000 hospitalizaciones al año.

La prevalencia de enteroparasitosis reportada en América Latina oscila entre 20 y 30% de la población general y 60 a 80% para poblaciones con alta endemia. En el Perú la prevalencia de giardiasis está alrededor de 15 a 18%, encontrándose en la Costa 17,8%, Sierra 15,4% y Selva 5% (Martínez *et al.*, 2011), afectando principalmente a la

población de bajos recursos socioeconómicos, con deficiencias de saneamiento básico como: disponibilidad de agua y desagüe (Torres *et al.*, 2011).

Las altas tasas de parasitismo intestinal reportada deben promover la creación inmediata de estrategias de control para prevenir el daño que ocasionan los enteroparásitos (Marcos *et al.*, 2000), siendo *Giardia* un protozoo con carácter endémico en diferentes zonas, alcanzando una prevalencia nacional del 15% (Bances *et al.*, 2013).

Se ha facilitado el estudio de *G. lamblia* gracias al reporte de varios medios para su crecimiento, entre ellos el TYI-S-33 descrito por Keister, el cual permite un desarrollo apropiado del parásito en un cultivo axénico (Rosales-Borja *et al.*, 2009) sin embargo, simular las condiciones del hospedero, especialmente en un sistema de cultivo *in vitro*, tiende a ser muy exigente porque implica una serie de variables que incluyen la forma parasitaria, la especie y/o cepa del parásito, la temperatura del hospedero entre otros (Nishat, 2014).

La aparición de diversos medios de cultivo para protozoarios ha permitido investigar distintos aspectos parasitarios en áreas como el diagnóstico, bioquímica e inmunología, entre otros (Rosales-Borja *et al.*, 2009) así mismo, para determinar sus necesidades nutricionales, comprender su organización ultraestructural, ciclo de vida y relación hospedero-parásito. También, es útil para la preparación de anticuerpos monoclonales y policlonales, para su utilización en pruebas inmunoserológicas (Nishat, 2014) y abrir las posibilidades del estudio de la respuesta del parásito frente a drogas mediante técnicas de susceptibilidad *in vitro* (Guerra, 2001).

Debido a la alta prevalencia de *Giardia* en el Perú, es necesario realizar estudios con el fin de buscar alternativas para su mejor tratamiento; para ello, se necesita de un medio de cultivo que cumpla con todos sus requerimientos nutricionales y parámetros ambientales que aseguren su óptimo crecimiento.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Etiología y Taxonomía

Giardia sp. fue visto por primera vez por Leewuenhoek en 1681. Lambl lo denomina intestinales (1859) y Stiles lo renombra *Giardia lamblia* en honor al Profesor Alfred Mathieu Giard (París) y al Dr. F. Lambl (Praga) en 1915. (Boreham *et al.*, 1990)(Coutinho, 1960).

Los protozoarios del género *Giardia* son organismos unicelulares binucleados, anaerobios facultativos (Cardona *et al.*, 2014) y flagelados que habitan en la parte superior del intestino delgado de muchas especies de vertebrados, entre ellos el humano, y es el agente responsable de la giardiasis (Luján, 2006) posee un esquema de clasificación basado en Linneo (Rivera *et al.*, 2002):

Reino: Protista

Phylum: Sarcomastigophora

Subphylum: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Diplomonadida

Suborden: Diplomonadina

Familia: Hexamitidae

Género: *Giardia*

2.2 Morfología

Presenta dos estadios evolutivos: Quiste (forma infectante) y trofozoito.

Los quistes tienen forma ovalada con una pared hialina y dimensiones de 8–12 / 7–10 μm siendo inicialmente binucleados. El quiste maduro posee cuatro núcleos, cuerpos medianos curvos y axonemas longitudinales, y es la forma resistente del parásito (Ivanov, 2010). Su principal característica es la presencia de una pared rígida de glicoproteínas externa que protege al parásito en condiciones ambientales muy hostiles, inclusive a la acción de desinfectantes (Adam, 2001) (**Fig 1**).



Fig 1: Quistes de *Giardia lamblia* a 40X coloreados con lugol.

El trofozoito posee dos núcleos iguales y simetría bilateral, con una superficie dorsal convexa, midiendo de 12 a 15 μm de largo por 5 a 9 μm de ancho, con cuatro pares de flagelos simétricos (dos anterolaterales, dos poslaterales, dos ventrales y dos caudales) y un disco suctor ubicado en su superficie ventral (Adam, 2001). Este disco mediante diversos mecanismos de hidroadhesión, le permite al parásito adherirse a la mucosa intestinal. Éste mide de 8 a 10 μ y no es simétrico (Sherffild y Bjorvatn, 1977).

Los cuerpos mediales poseen una naturaleza citointraplasmática que se les asocia con la división celular, reserva de lipoproteínas y soporte de la región terminal. Estos cuerpos pueden estar presentes o no en el parásito. (Ackers, 1980) (**Fig 2**)



Fig 2: Trofozoitos de *Giardia lamblia* a 40X con tinción tricròmica

2.3 Ciclo de vida

El ciclo biológico de *G. lamblia* presenta dos estadios evolutivos: El trofozoito (forma vegetativa), cuyo hábitat es el intestino delgado, responsable de las formas invasiva del parásito; y el quiste (forma infectante y de resistencia) responsable de la transmisión de parásito (Karapetyan, 1962).

Luego de la ingestión del quiste maduro tetranucleado, ocurre el proceso de exquistación, que se inicia cuando los quistes pasan por el estómago y los jugos gástricos (ácidos) inducen este proceso. Posteriormente, los jugos pancreáticos (alcalinos) terminan de destruir la pared quística (Meyer, 1970) y como resultado emergen dos trofozoitos que se multiplican asexualmente en la superficie de la mucosa del intestino delgado (duodeno y primeras porciones del yeyuno), ocasionando el síndrome de malabsorción y otras manifestaciones clínicas recurrentes. Una vez colonizado el intestino delgado, estos son arrastrados por el bolo alimenticio hacia el intestino grueso, donde el cambio enzimático y la falta de agua son

detonantes para que los trofozoitos comiencen a enquistarse, los quistes producidos son eliminados al exterior y luego de un proceso de maduración se vuelven infectivos.

(Anexo 1)

2.4 Epidemiología

Giardia lamblia fue considerada por muchos años como comensal, no patógeno del intestino; sin embargo, hace solo 25 años que se considera patógena y dependiendo del estado inmunológico de la persona puede o no causar sintomatología. Su incidencia varía entre 0,5 a 20%; con prevalencia de 20 a 30% en países en desarrollo y de 2 a 5% en países industrializados. La infección producida por este parásito es la más común causada por protozoarios y ocurre desde el trópico hasta la región de los polos, sin embargo la incidencia es mayor en regiones de clima templado. Se estima que cerca de 200 millones de personas se infectan anualmente por *Giardia lamblia* en Asia, Africa y América Latina (Alparo, 2005).

La principal fuente de infección es el agua no potable, el agua contaminada con heces humanas o alimentos contaminados con materia fecal debido a la manipulación con las manos sucias de personas infectadas (Chacón y Jiménez, 2010).

Las manifestaciones clínicas usualmente comienzan semanas después de la ingestión de los quistes. Estas se caracterizan por diarreas, flatulencia, dolor e inflamación abdominal, anorexia, pérdida de peso y malestar general. La aparición de vómitos y fiebre es menos frecuente, y la presencia de sangre o mucus en las heces es rara (Ali *et al.*, 2008)

2.5 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* de organismos en cualquiera de las etapas dentro de su ciclo de vida implica muchas variables, incluida la etapa del parásito, el sitio del huésped, la temperatura del huésped, las respuestas inmunes del huésped, las especies y / o

cepas de parásitos y los mecanismos de protección del parásito. Simular las condiciones internas del huésped en un sistema de cultivo *in vitro* puede ser extremadamente exigente (Visvesvara y García., 2002).

En el año 1960, Karapetyan describió un método con el cual había cultivado trofozoítos de *Giardia* proveniente de un hombre durante siete meses, para ello utilizó un medio de cultivo complejo que contenía a la cepa *Candida guilliermondii* y fibroblastos de pollo. Una vez que estableció el crecimiento de *Giardia*, continuó replicando pero sin la presencia de los fibroblastos de pollo en el medio, ya que se observó que no era necesaria su presencia para el crecimiento del parásito; sin embargo, en ausencia de *Candida*, los trofozoitos de *Giardia* no pudieron crecer. Años más tarde, en 1962, Karapetyan volvió a cultivar a *Giardia* proveniente de un conejo durante cinco meses, pero esta vez en ausencia de los fibroblastos de pollo y en presencia de la cepa *Saccharomyces cerevisiae*.

Meyer y Pope (1965) realizaron una modificación al método de cultivo propuesto por Karapetyan en el cual añadían diariamente levaduras viables de *S. cerevisiae* a los medios de cultivo nuevos donde se hacían la resiembra de los trofozoitos. Esta modificación resultó ser exitosa y lograron cultivar a *Giardia* proveniente de un conejo durante 18 meses y a *Giardia* de una chinchilla durante 14 meses.

En el año 1976, la revista Experimental Parasitology publicó un estudio sobre el aislamiento y cultivo axénico de *G. lamblia* (Meyer, 1976) donde se observaron trofozoítos al cultivarlos en medio líquido. El medio se cambió después de 2 a 3 días obteniendo así numerosos subcultivos. Los cultivos de trofozoítos permanecieron viables, después de la congelación en presencia de glicerol, durante 14 meses. Este fue el primer cultivo axénico informado de *G. lamblia*.

En el año 1980, la revista Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene publicó un estudio sobre el crecimiento axénico de *G. lamblia* en medio TP-S-

1 de Diamond (Visvesvara, 1980) cultivada a 37°C durante 144 horas observando una concentración de 2.1×10^4 trofozoitos/ml a 2.2×10^6 trofozoitos/ml y un tiempo de generación de 12.2 horas.

Posteriormente se publicó un estudio sobre el Cultivo axénico de *G. lamblia* en medio TYI-S-33 suplementado con bilis (Keister, 1983) agregando al medio de cultivo preparaciones de sales biliares para mejorar el crecimiento del parásito en el medio TP-S-1. Los tubos de cultivo se incubaron a 36 ° C en una posición horizontal en una ligera inclinación y se subcultivaron a intervalos de 72 y 96 horas obteniendo una concentración de 2×10^4 a 2×10^5 trofozoitos.

Farthing *et al.* (1983) realizó un estudio utilizando bilis de mamíferos concluyendo que este componente promueve el crecimiento axénico de *G. lamblia* en medio TYI-S modificado de Diamond con un tiempo de generación de 12 ± 1.1 horas. Inicialmente las curvas de crecimiento se construyeron a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas. Se consideró que el medio TYI-S suplementado con bilis produce un mayor crecimiento del parásito que en el medio TPS-1.

En el 2009 (Rosales-Borja *et al.*), se dio a conocer el medio de Keister modificado para el cultivo de *G. lamblia in vitro* donde se observa el crecimiento en condiciones axénicas en medio TYI-S-33 a 37°C enriquecido con suero bovino, los trofozoitos se inocularon de un cultivo de 72 horas y la curva de crecimiento se realizó durante 144 horas.

Cabe resaltar que, en el Perú, no existen estudios de estandarización de cultivo para enteroparásitos como es el caso de *Giardia* spp.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

- El medio TYI-S-33 artesanal es significativamente un mejor promotor del crecimiento de trofozoitos de *G. lamblia* que el medio TYI-S-33 comercial.

3.2 OBJETIVO PRINCIPAL

- Evaluar los parámetros de tiempo, temperatura y concentración de antimicrobianos para el crecimiento de *Giardia lamblia* en medio de cultivo TYI-S-33 comercial y artesanal.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la concentración de antimicrobianos que aseguren el crecimiento axénico *in vitro* de *Giardia lamblia* en medio de cultivo
- Evaluar la curva de crecimiento de *Giardia lamblia* en medio de cultivo TYI-S-33 comercial y artesanal.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Material Biológico

Se trabajó con la cepa de *Giardia intestinalis* ATCC 30957 criopreservada a -70°C procedente de un aspirado duodenal de un paciente varón, año 1979 (**Fig 3**)



Fig 3: Cepa de *Giardia intestinalis* ATCC 30957

4.2 Preparación de medio de cultivo

4.2.1 Medio de cultivo TYI-S-33 comercial

Se preparó según su inserto: Se limpió con alcohol y quitó con cuidado el tapón del frasco que contiene el medio a hidratar, se agregó 15 ml de agua bidestilada estéril y se homogenizó hasta que se disolvió todo el contenido; una vez disuelto se suplementó con 10% de suero bovino fetal y se volvió a homogenizar. Se dispensó en tubos de vidrio tapa rosca estériles 13 x 100 para su uso. Todo el procedimiento de preparación del medio se realizó en cabina de flujo laminar para asegurar su esterilidad.

MEDIO TYI-S-33 comercial

Caseína digerida	20.0 g
Extracto levadura	10.0 g
NaCl	2.0 g
L-cysteina HCl	2.0 g
Ácido ascórbico	0.2 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
Bilis bovina deshidratada.....	0.75 g
Citrato férrico de amonio.....	22 mg
Vitaminas Diamond's.....	20 ml
Suero bovino inactivo.....	100 ml
Agua bidestilada.....	880 ml

4.2.2 Medio de cultivo TYI-S-33 artesanal

Se pesó en la balanza analítica los 10 insumos que el medio requiere y se diluyó en agua bidestilada, se suplementó con 10% de suero bovino fetal, se ajustó el pH a 7.1, se esterilizó por filtración y se dispensó en tubos de vidrio tapa rosca 13 x 100 para su uso. Todo el procedimiento de preparación del medio se realizó en cabina de flujo laminar para asegurar su esterilidad (**Fig 4**).

MEDIO TYI-S-33 artesanal

Caseína digerida	20.0 g
Extracto levadura	10.0 g
NaCl	2.0 g
L-cysteina HCl	2.0 g

Ácido ascórbico	0.2 g
K ₂ HPO ₄	1.0 g
KH ₂ PO ₄	0.6 g
Glucosa.....	10.0 g
Bilis bovina.....	0.76 g
Citrato férrico de amonio.....	0.02 g
Vitaminas Diamond's.....	20 ml
Suero bovino inactivo.....	100 ml
Agua bidestilada.....	880 ml

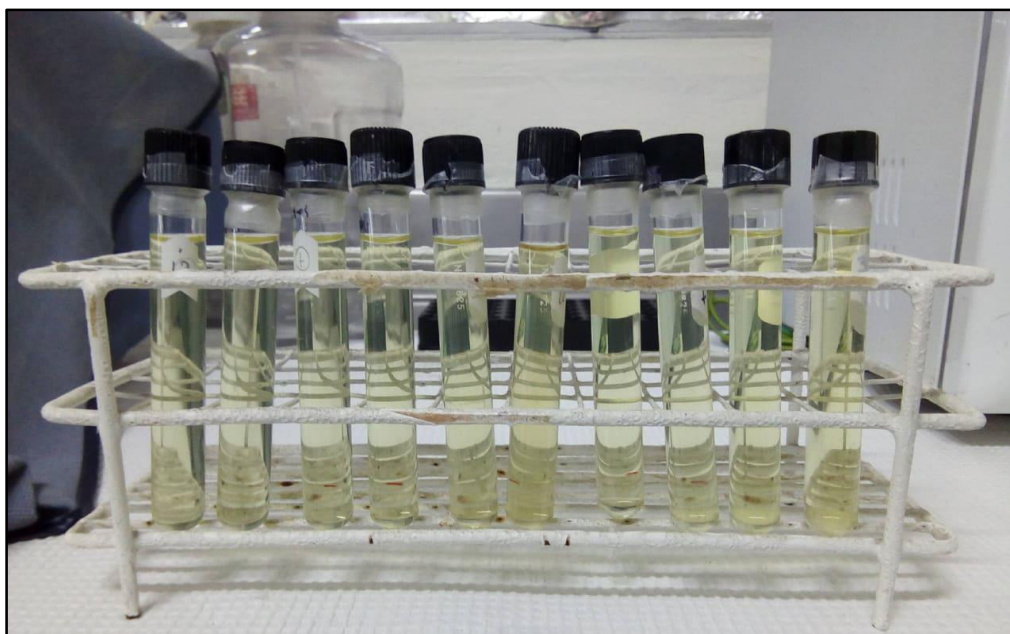


Fig 4: Medio TYI-S-33 artesanal dispensado en tubos de 13x100 mm

4.3. Reactivación de la cepa de *Giardia*

Se colocó el vial que contiene la cepa de *Giardia* en baño maría a 37°C por 2 a 3 minutos hasta que se descongeló, una vez descongelado se llevó a una cabina de bioseguridad donde se transfirió el contenido del vial a un tubo de ensayo de vidrio con tapa rosca 16 x 125 conteniendo 13 ml de medio TYI-S-33 ATCC comercial (**Fig 5**) y

se incubó a 37°C por 90 horas con una inclinación horizontal de 15°C. Se realizó el pasaje a un medio nuevo cada 72 horas.

Para determinar la carga parasitaria presente en los cultivos se utilizó la siguiente fórmula:

$$Carga\ parasitaria\left(\frac{t}{ml}\right)=\frac{(N^{\circ}\text{ trofozoitos contados})\times 10^4}{4 \times \text{factor dilución}}$$

Para determinar la viabilidad parasitaria de los trofozoitos se utilizó la siguiente fórmula:

$$Viabilidad\ parasitaria\ (\%) = \frac{(N^{\circ}\text{ trofozoitos vivos})}{(N^{\circ}\text{ trofozoitos vivos}+N^{\circ}\text{ trofozoitos muertos})} \times 100$$

Así mismo, para determinar la deformidad parasitaria de los trofozoitos se utilizó la siguiente fórmula:

$$Deformidad\ parasitaria\ (\%) = \frac{(N^{\circ}\text{ trofozoitos con forma normal})}{(N^{\circ}\text{ trofozoitos con forma normal} + N^{\circ}\text{ trofozoitos con forma anormal})} \times 100$$



Fig 5: Reactivación de cepa de *Giardia lamblia* en medio comercial TYI-S-33

4.4. Preparación de antimicrobianos a diferentes concentraciones

Se colocó 7 ml de medio de cultivo a pH 7.1 en tubos de vidrio 13 x 100 tapa rosca al 80% de su capacidad total suplementado con antibióticos: Penicilina, estreptomicina, amikacina y gentamicina a diferentes concentraciones a fin de optimizar el crecimiento, luego se inoculó 500ul de suspensión de trofozoítos a una concentración de 22000 parásitos por ml en tubos con medio y se incubó a 37°C. A las 72 horas los medios de cultivo se sometieron a un baño de frío 4°C por 10 min (**Fig 6**) y se centrifugaron a 2300 rpm por 5 minutos (**Fig 7**), se descartó el sobrenadante dejando 1 ml del sedimento del medio. Se tomó 10 ul del medio, se homogenizó con 10 ul de azul de tripan, se realizó, utilizando una cámara de Neubauer, el conteo de trofozoitos por ml y se evaluó la disminución de la contaminación de los medios de cultivo.



Fig 6: Medios de cultivo en baño de frío 4°C por 10 min



Fig 7: Medios de cultivo centrifugados a 2300 rpm por 5 minutos

4.5. Curva de crecimiento

Se colocó 7 ml de medio de cultivo TYI-S-33 artesanal y 7 ml de medio TYI-S-33 comercial por separado en tubos de vidrio 13 x 100 con tapa rosca a 37 °C, agregándolo hasta el 80% de su capacidad total y suplementados con la concentración de antibióticos determinada. Luego se inoculó 500ul de suspensión de trofozoítos purificados en los tubos con medio comercial y artesanal. Se incubó a tres temperaturas diferentes 36°C, 36.5°C y 37°C, y cada 24 horas se realizó el conteo de trofozoítos por ml utilizando la cámara de Neubauer (**Fig 8**). La viabilidad del protozooario se determinó por medio de la exclusión del azul de tripán cada 24 horas hasta cumplir las 216 horas. Este procedimiento se realizó por triplicado. (**Fig 9**).

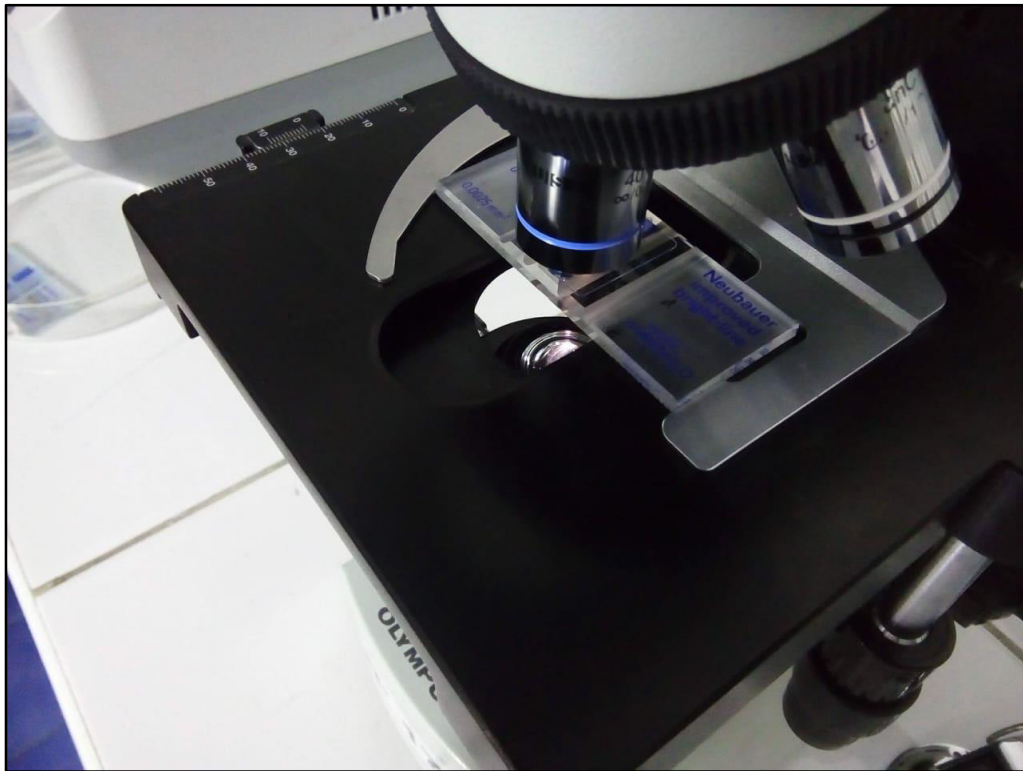


Fig 8: Conteo de trofozoitos en cámara de Neubauer

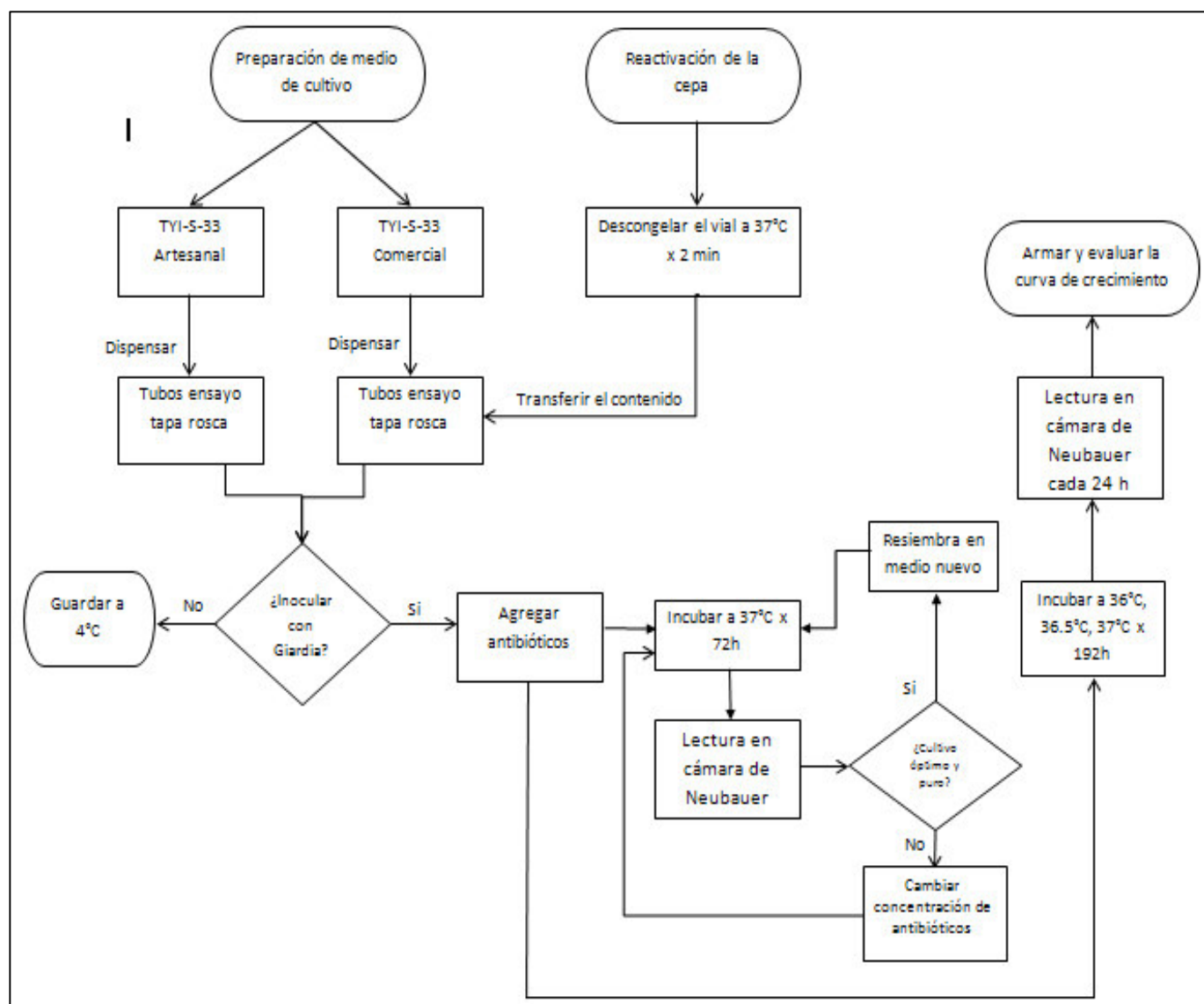


Fig 9: Flujograma de trabajo

V. RESULTADOS

5.1 Reactivación de la cepa

La cepa se reactivó en un tubo de ensayo tapa rosca de vidrio 16 x 125 mm con medio de cultivo TYI-S-33 comercial, se incubó a 37°C y luego de 90 horas se realizó el recuento usando la cámara de Neubauer (**Fig. 10**)

i. Estimación de la carga parasitaria

La carga parasitaria se determinó por duplicado:

$$N^{\circ} \text{ Trofozoitos 1 (t/ml)} = \frac{(474) \times 10^4}{4 \times 0.5} = 2.37 \times 10^6$$

$$N^{\circ} \text{ Trofozoitos 2 (t/ml)} = \frac{(548) \times 10^4}{4 \times 0.5} = 2.74 \times 10^6$$

Se obtuvo una carga parasitaria promedio de **2.55 x 10⁶ trofozoitos/ml**

ii. Estimación de la viabilidad parasitaria

La viabilidad parasitaria se determinó también por duplicado

$$\text{Viabilidad 1} = \frac{(364)}{474} \times 100 = 76.79\%$$

$$\text{Viabilidad 1} = \frac{(403)}{548} \times 100 = 73.54\%$$

Se obtuvo una viabilidad parasitaria promedio de **75.16 %**

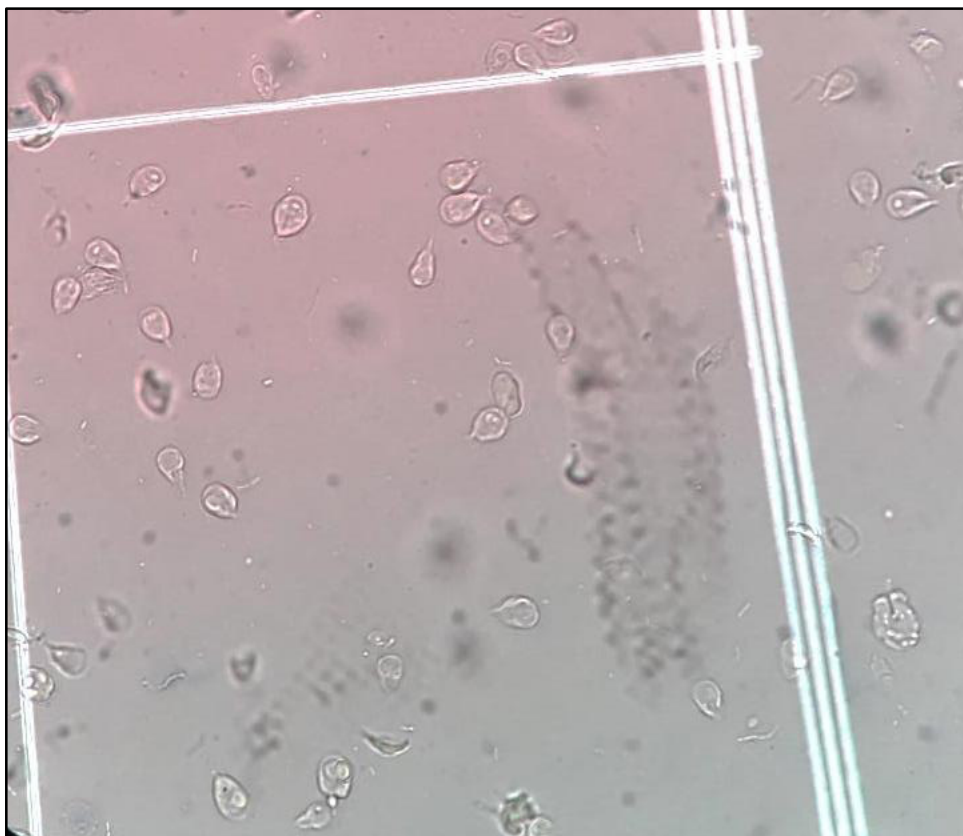


Fig. 10: Trofozoitos de *Giardia lamblia* a 40X reactivados en medio TYI-S-33 comercial

De ese cultivo se sembró alícuotas de 0.5ml en cinco contenedores diferentes: Frasco de cultivo celular, eppendorf 1.5ml, tubo de ensayo de vidrio tapa rosca 16 x 125 mm, tubo de ensayo de vidrio tapa rosca 13 x 100 mm (contenían medio TYI-S-33 comercial) y tubo de ensayo de vidrio tapa rosca 16 x 125 mm (contenía medio TYI-S-33 artesanal); se incubó a 37°C durante 72 horas y se realizó la lectura correspondiente observándose que en los contenedores de plástico no creció el parásito pero en los de vidrio si, optando por utilizar los tubos de ensayo de vidrio tapa rosca 13 x 100 mm.

Las resiembras del cultivo se realizaron tanto en medio TYI-S-33 comercial como en TYI-S-33 artesanal para evaluar la carga y viabilidad parasitaria en ambos medios y determinar en cuál de los dos medios el crecimiento es mejor. Los resultados se pueden apreciar en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Carga, viabilidad y deformidad de *Giardia lamblia* en medio de cultivo

TYI-S-33 comercial y artesanal

TYI-S-33 COMERCIAL			TYI-S-33 ARTESANAL		
Carga parasitaria	Viabilidad	Deformidad*	Carga parasitaria	Viabilidad	Deformidad*
1.06 x 10 ⁶ t/ml	79.10%	20%	1.71 x 10 ⁶ t/ml	94.70%	5%
1.68 x 10 ⁶ t/ml	86.30%	18%	1.5 x 10 ⁶ t/ml	78.32%	8%
2.78 x 10 ⁶ t/ml	91.90%	20%	5.44 x 10 ⁶ t/ml	94.20%	5%
1.54 x 10 ⁶ t/ml	76.67%	22%	3.58 x 10 ⁶ t/ml	92.39%	3%
1.69 x 10 ⁶ t/ml	84.50%	20%	9.35 x 10 ⁵ t/ml	82%	8%
2.05 x 10 ⁶ t/ml	88.90%	25%	2.79 x 10 ⁶ t/ml	100%	6%
5.67 x 10 ⁶ t/ml	95.13%	15%	4.69 x 10 ⁶ t/ml	96.60%	2%
2.73 x 10 ⁶ t/ml	90.09%	2%	3.15 x 10 ⁶ t/ml	88%	10%
4.35 x 10 ⁶ t/ml	96.60%	15%	3.57 x 10 ⁶ t/ml	89.90%	5%
2.5 x 10 ⁶ t/ml	92.08%	20%	3.16 x 10 ⁶ t/ml	93.90%	15%
8.09 x 10 ⁶ t/ml	96.59%	2%	5.15 x 10 ⁶ t/ml	94.40%	1%
1.35 x 10 ⁵ t/ml	100%	10%	5.41 x 10 ⁶ t/ml	94.01%	1%
2.3 x 10 ⁵ t/ml	100%	5%	4.03 x 10 ⁶ t/ml	97.22%	2%
3.3 x 10 ⁵ t/ml	95.65%	8%	4.92 x 10 ⁶ t/ml	94.52%	15%
1.95 x 10 ⁵ t/ml	95.12%	5%	6.52 x 10 ⁶ t/ml	93.54%	12%
4.45 x 10 ⁵ t/ml	88.10%	5%	3.69 x 10 ⁶ t/ml	95.23%	8%
1.3 x 10 ⁵ t/ml	100%	15%	3.54 x 10 ⁶ t/ml	95.54%	10%
1.01 x 10 ⁶ t/ml	98%	10%	3.57 x 10 ⁶ t/ml	94.94%	1%
1.75 x 10 ⁵ t/ml	63.3%	3%	5.38 x 10 ⁶ t/ml	95.05%	5%
2.7 x 10 ⁵ t/ml	77.14%	10%	4.89 x 10 ⁶ t/ml	96.07%	5%
6 x 10 ⁵ t/ml	95.13%	10%	7.05 x 10 ⁶ t/ml	95.92%	3%
1.33 x 10 ⁶ t/ml	94.68%	10%	3.15 x 10 ⁵ t/ml	100%	8%
1.77 x 10 ⁶ t/ml	90.23%	12.27%	3.86 x 10 ⁶ t/ml	93.48%	6.27%

* Se consideran trofozoitos deformes a aquellos que presentan una morfología rugosa, en forma de roseta o cualquier forma ajena a la forma lanceolada natural que presenta el parásito.

Con los datos obtenidos se realizó la prueba estadística ANOVA para determinar si el medio TYI-S-33 artesanal difiere significativamente con el medio TYI-S-33 comercial obteniendo los siguientes valores:

Con respecto a la **carga parasitaria**, el valor de p fue de **0.000649642**, menor al valor alpha de **0.05** lo que significa que los medios TYI-S-33 artesanal y comercial si difieren significativamente uno con el otro. (**Tabla 2**)

Con respecto a la **viabilidad parasitaria**, el valor de p fue de **0.158288956**, mayor al valor alpha de **0.05** lo que significa que los medios TYI-S-33 artesanal y comercial no difieren significativamente uno con el otro. (**Tabla 3**)

Por último, la **deformidad parasitaria** posee un valor p de **0.003192154**, menor al valor alpha de 0.05 lo que significa que los medios TYI-S-33 artesanal y comercial si difieren significativamente uno con el otro. (**Tabla 4**)

Con estos valores se puede concluir que el medio TYI-S-33 artesanal es más óptimo con relación al medio TYI-S-33 comercial ya que se obtiene una carga parasitaria mayor con una mínima deformación de los trofozoitos.

Tabla 2: Prueba de ANOVA para la carga parasitaria

DESCRIPCION					Alpha	0.05		
<i>Grupo</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Suma</i>	<i>Media</i>	<i>Varianza</i>	<i>SS</i>	<i>Std Error</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
TYI-S-33 Comercial	22	38990	1772.272727	4091027.922	85911586.36	401.2567023	962.5039182	2582.041536
TYI-S-33 Artesanal	22	84990	3863.181818	2993277.489	62858827.27	401.2567023	3053.413009	4672.950627

ANOVA								
<i>Fuente</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P valor</i>	<i>F critica</i>	<i>RMSSE</i>	<i>Omega Sq</i>
Entre grupos	48090909.09	1	48090909.09	13.57674643	0.000649642	4.072653759	0.785572936	0.222295328
Dentro de grupos	148770413.6	42	3542152.706					
Total	196861322.7	43	4578170.296					

Tabla 3: Prueba de ANOVA para la viabilidad parasitaria

DESCRIPCION					Alpha	0.05		
<i>Grupo</i>	<i>Cantidad</i>	<i>Suma</i>	<i>Media</i>	<i>Varianza</i>	<i>SS</i>	<i>Std Error</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>
TYI-S-33 Comercial	22	1985.05%	90.23%	0.008643333	0.18150999	0.015976352	0.87005387	0.934537039
TYI-S-33 Artesanal	22	2056.45%	93.48%	0.002587396	0.054335315	0.015976352	0.902508416	0.966991584

ANOVA								
<i>Fuente</i>	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>P valor</i>	<i>F critica</i>	<i>RMSSE</i>	<i>Omega Sq</i>
Entre grupos	0.011586273	1	0.011586273	2.063316272	0.158288956	4.072653759	0.306246801	0.02359605
Dentro de grupos	0.235845305	42	0.005615364					
Total	0.247431577	43	0.005754223					

Tabla 4: Prueba de ANOVA para la deformidad parasitaria

DESCRIPCION		Alpha			0.05			
Grupo	Cantidad	Suma	Media	Varianza	SS	Std Error	Inferior	Superior
TYI-S-33 Comercial	22	270%	12%	0.005001732	0.105036364	0.012021437	0.09846703	0.146987515
TYI-S-33 Artesanal	22	153%	7%	0.001356926	0.028495455	0.012021437	0.045285212	0.093805697

ANOVA								
Fuente	SS	df	MS	F	P valor	F critica	RMSSE	Omega Sq
Entre grupos	0.031111364	1	0.031111364	9.785512476	0.003192154	4.072653759	0.666930297	0.16643795
Dentro de grupos	0.133531818	42	0.003179329					
Total	0.164643182	43	0.003828911					

5.2 Preparación de antimicrobianos a diferentes concentraciones

El cultivo TYI-S-33 es muy rico en nutrientes así que es fácilmente contaminable (**Fig. 11**), es por ello que se le agregó antibióticos (Penicilina, Estreptomicina, Amikacina y Gentamicina) a diferentes concentraciones a fin de disminuir la carga bacteriana y optimizar el crecimiento del parásito. Las diferentes concentraciones se pueden apreciar en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Concentración de antibióticos

Penicilina	Estreptomicina	Gentamicina	Amikacina
394 U/ml	394 µg/ml	-	-
541 U/ml	541 µg/ml	-	-
394 U/ml	394 µg/ml	50 µg/ml	-
541 U/ml	541 µg/ml	50 µg/ml	-
394 U/ml	394 µg/ml	-	50 µg/ml
394 U/ml	394 µg/ml	50 µg/ml	156 µg/ml
394 U/ml	394 µg/ml	-	220.6 µg
394 U/ml	394 µg/ml	70.6 µg/ml	220.6 µg/ml
541 U/ml	541 µg/ml	50 µg/ml	156 µg/ml
394 U/ml	394 µg/ml	94 µg/ml	-

Las resiembras se realizaron en medios de cultivo que contenían las diferentes combinaciones y concentraciones de los antibióticos a fin de observar las diferencias en cada medio con respecto a la contaminación bacteriana.

Con la combinación de penicilina (394 U/ml) y estreptomicina (394 µg/ml) la contaminación bacteriana no disminuía, al contrario, se pudo apreciar que en algunos medios aumentaba ligeramente.

Con la combinación de penicilina (541 U/ml) y estreptomicina (541 µg/ml) la contaminación bacteriana seguía sin disminuir.

Con la combinación de penicilina (394 U/ml), estreptomicina (394 µg/ml) y gentamicina (50 µg/ml) la contaminación bacteriana disminuyó ligeramente.

Con la combinación de penicilina (541 U/ml), estreptomicina (541 µg/ml) y gentamicina (50 µg/ml) la contaminación bacteriana disminuyó un poco más que la combinación anterior pero no lo suficiente.

Con la combinación de penicilina (394 U/ml), estreptomicina (394 µg/ml) y amikacina (50 µg/ml) la contaminación bacteriana se mantuvo.

Con la combinación de penicilina (394 U/ml), estreptomicina (394 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y amikacina (156 µg/ml) la contaminación bacteriana disminuyó considerablemente a tal punto de casi desaparecer (**Fig. 12**).

Con la combinación de penicilina (394 U/ml), estreptomicina (394 µg/ml), y amikacina (220.6 µg/ml) la contaminación bacteriana disminuyó considerablemente, pero se observó precipitados azules debido tal vez a una elevada concentración de amikacina (**Fig. 13**).

Con la combinación de penicilina (394 U/ml), estreptomicina (394 µg/ml), gentamicina (70.6 µg/ml) y amikacina (220.6 µg/ml) la contaminación bacteriana disminuyó

considerablemente, pero se observó nuevamente grandes cantidades de precipitados azules y deformidad en algunos trofozoitos (**Fig. 14**).

Con la combinación de penicilina (541 U/ml), estreptomicina (541 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y amikacina (156 µg/ml) la contaminación bacteriana disminuyó considerablemente casi desapareciéndola, pero se empezó a notar algunos pocos precipitados azules.

Finalmente, con la combinación de penicilina (394 U/ml), estreptomicina (394 µg/ml) y gentamicina (94 µg/ml) la contaminación bacteriana disminuyó pero no lo suficiente.

Analizando los resultados obtenidos de las 10 combinaciones y concentraciones diferentes de antibióticos, la que dio mejor resultado fue la combinación de **penicilina (394 U/ml), estreptomicina (394 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y amikacina (156 µg/ml)**. Con esta combinación se empezó a trabajar agregándola a cada tubito con medio de cultivo a ser sembrado.



Fig. 11: Cultivo de *Giardia lamblia* a 40X con contaminación bacteriana

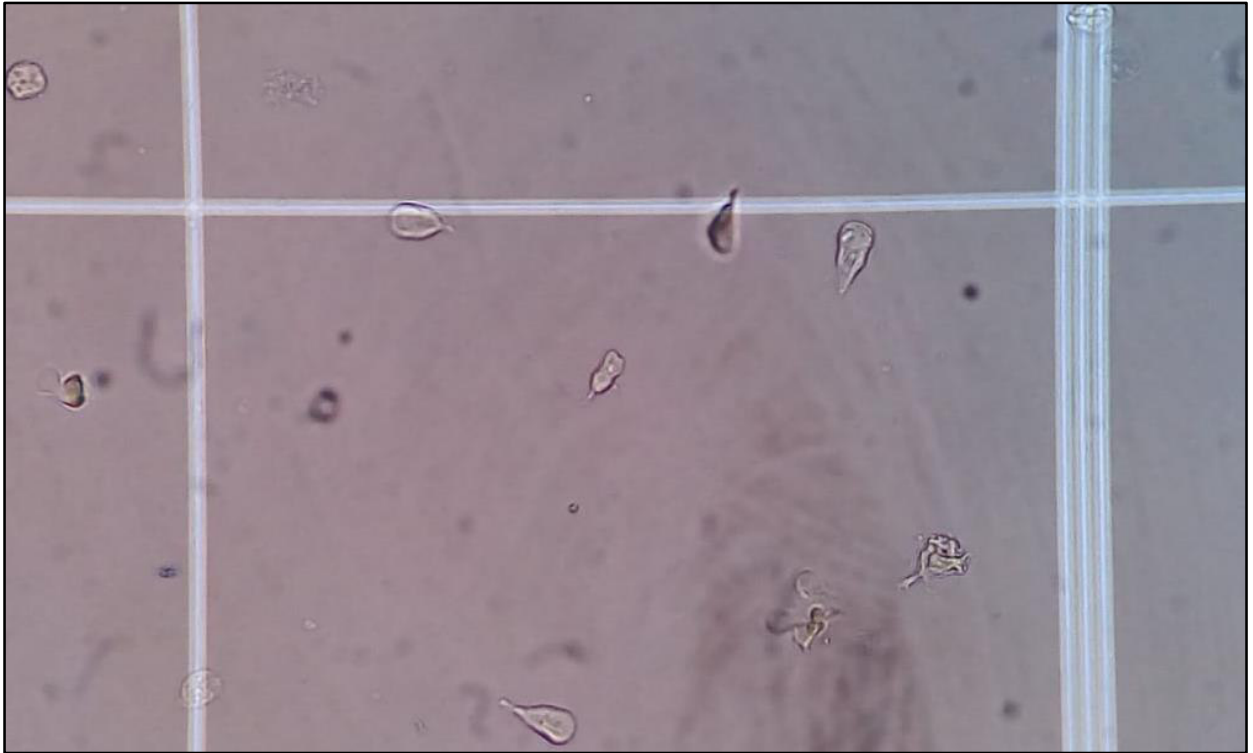


Fig. 12: Cultivo de *Giardia lamblia* a 40X con antibióticos seleccionados

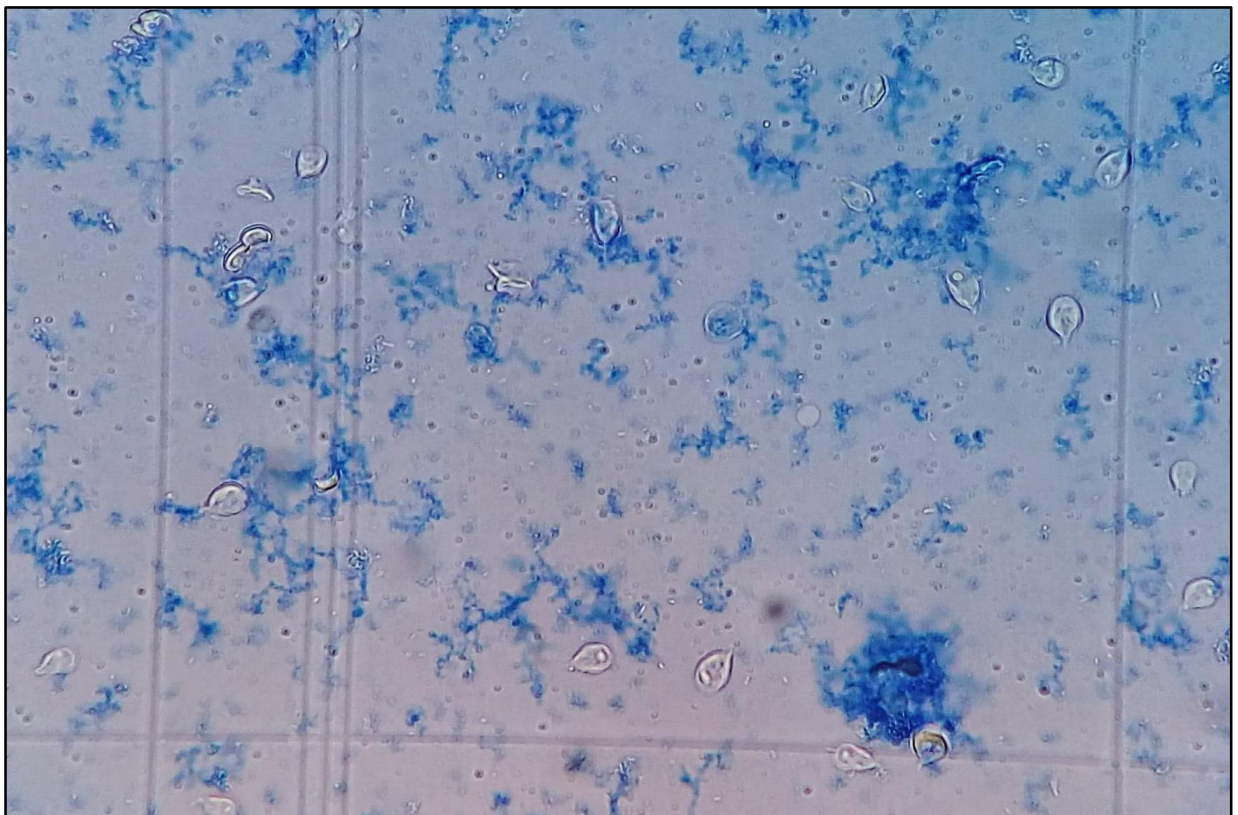


Fig. 13: Cultivo de *Giardia lamblia* a 40X con precipitado azul

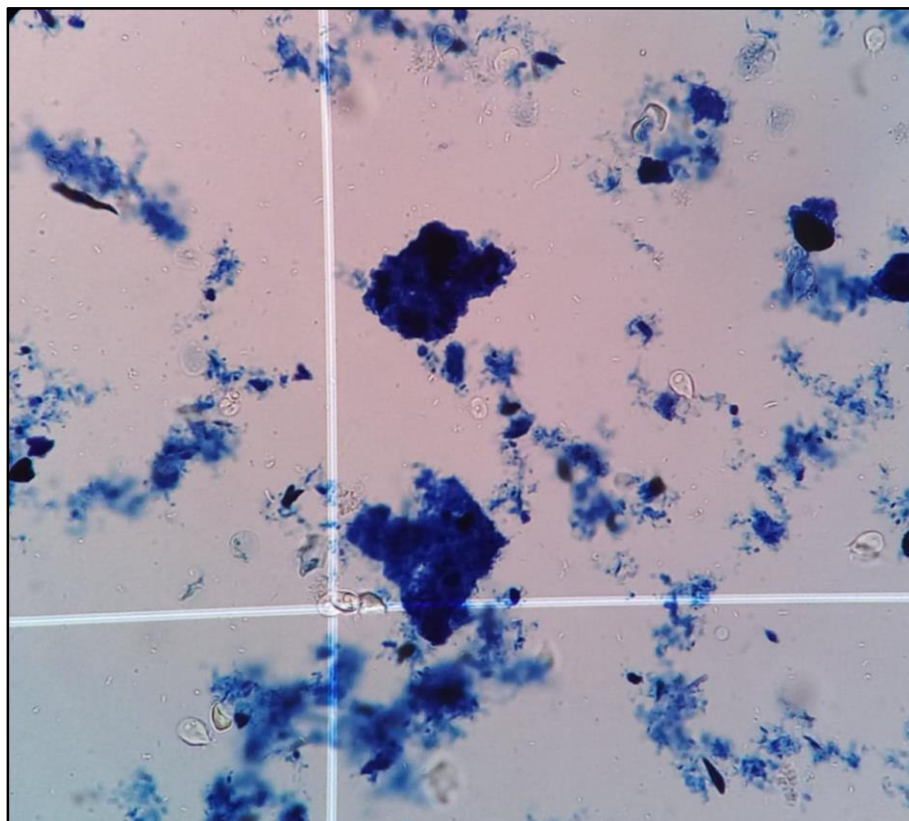


Fig. 14: Cultivo de *Giardia lamblia* a 40X con precipitado azul y deformidad de trofozoitos

5.3 Curva de crecimiento

Para determinar la cinética de crecimiento de *Giardia* se evaluaron 9 tiempos medidos en horas 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, 144h, 168 h, 192h y 216h los que fueron incubados a 3 temperaturas diferentes, 36°C, 36.5°C y 37°C en posición horizontal con una inclinación de 15°. Se trabajó con el medio TYI-S-33 artesanal y el medio comercial TYI-S-33 ATCC2695. El inóculo de siembra fue 4.97×10^4 trofozoitos/ml con una viabilidad del 98.68%.

Los resultados obtenidos al emplear el medio TYI-S-33 artesanal indican que la temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, estos datos se muestran en la **tabla 6**, el promedio de los recuentos de trofozoitos en ambos medios, se observan en la **tabla 7**, determinando así que el medio TYI-S-33 artesanal (suplementado con glucosa al 10%) presenta mejor desempeño en el cultivo *in vitro* de *Giardia lamblia*.

Tabla 6: Carga parasitaria de *Giardia lamblia* en medio de cultivo TYI-S-33 artesanal a 36°C, 36.5°C y 37°C

Tiempo (horas)		Temperatura								
		36°C			36.5°C			37°C		
24	Carga	6.5 x 10 ⁴	9.5 x 10 ⁴	9.5 x 10 ⁴	9.75 x 10 ⁵	1.3 x 10 ⁵	7 x 10 ⁴	1.35 x 10 ⁵	6 x 10 ⁴	1.2 x 10 ⁵
	Viabilidad	100%	100%	99.48%	99.48%	100%	100%	96.40%	100%	96%
48	Carga	9.5 x 10 ⁴	2.7 x 10 ⁵	5.31 x 10 ⁴	4.95 x 10 ⁵	2.15 x 10 ⁵	1.75 x 10 ⁵	4.2 x 10 ⁵	3.35 x 10 ⁵	3.49 x 10 ⁵
	Viabilidad	100%	100%	94.40%	100%	100%	95%	90.70%	100%	98.80%
72	Carga	3.15 x 10 ⁵	4.3 x 10 ⁵	2.2 x 10 ⁵	6.4 x 10 ⁵	5 x 10 ⁵	6 x 10 ⁴	4.9 x 10 ⁵	6.05 x 10 ⁵	5.9 x 10 ⁵
	Viabilidad	96.92%	96.62%	100%	100%	100%	-	96.07%	96.80%	100%
96	Carga	2.29 x 10 ⁶	2.39 x 10 ⁶	1.06 x 10 ⁶	1.14 x 10 ⁶	7.55 x 10 ⁵	7 x 10 ⁴	1.3 x 10 ⁶	1.93 x 10 ⁶	5 x 10 ⁶
	Viabilidad	99.78%	100%	100%	99.56%	100%	100%	100%	99.48%	95.60%
120	Carga	7.07 x 10 ⁶	2.65 x 10 ⁶	8.9 x 10 ⁵	1.26 x 10 ⁶	4.74 x 10 ⁶	1.71 x 10 ⁶	1.33 x 10 ⁷	1.18 x 10 ⁷	2.34 x 10 ⁶
	Viabilidad	98.74%	98.69%	97.80%	97.66%	99.05%	97.98%	99.96%	99.57%	93.57%
144	Carga	1.02 x 10 ⁶	9.89 x 10 ⁶	1.55 x 10 ⁵	1.03 x 10 ⁶	1.02 x 10 ⁷	7.27 x 10 ⁶	1.33 x 10 ⁷	1.09 x 10 ⁷	1.27 x 10 ⁶
	Viabilidad	91.07%	99.14%	100%	99.03%	98.93%	99.86%	98.86%	98.54%	90.39%
168	Carga	1.32 x 10 ⁷	3.1 x 10 ⁵	1.29 x 10 ⁷	1.32 x 10 ⁷	3.1 x 10 ⁵	1.29 x 10 ⁷	1.11 x 10 ⁷	1.23 x 10 ⁷	8.6 x 10 ⁶
	Viabilidad	98.87%	86.11%	99.46%	99.37%	99.37%	100%	97.97%	97.31%	100%
192	Carga	9 x 10 ⁴	1.25 x 10 ⁵	5 x 10 ⁴	7.78 x 10 ⁶	5 x 10 ³	5 x 10 ⁴	R.E	1.21 x 10 ⁷	8.1 x 10 ⁶
	Viabilidad	85.70%	100%	100%	99.29%	100%	100%	R.E	97.34%	94.73%
216	Carga	1.10 x 10 ⁷	1.22 x 10 ⁷	9.07 x 10 ⁶	R.E	3.47 X 10 ⁶	3.47 X 10 ⁶	5.28 X 10 ⁶	3.28 X 10 ⁶	3.74 X 10 ⁶
	Viabilidad	97.83%	95.76%	97.06%	R.E	96.52%	98.18%	68.15%	43.94%	69.06%

Tabla7: Carga parasitaria promedio de *Giardia lamblia* en medio TYI-S-33 artesanal y comercial a 36°C, 36.5°C y 37°C

Tiempo (horas)	Medio Artesanal			Medio comercial		
	Temperatura			Temperatura		
	36°C	36.5°C	37°C	36°C	36.5°C	37°C
24	6.5 X 10 ⁴	1.3 X 10 ⁵	1.35 X 10 ⁵	5.5 X 10 ⁴	5.5 X 10 ⁴	5.4 X 10 ⁴
48	2.7 X 10 ⁵	2.15X 10 ⁵	4.2 X 10 ⁵	1.2 X 10 ⁵	1.7X 10 ⁵	5.5 X 10 ⁴
72	4.3 X 10 ⁵	5 X 10 ⁵	6.05 X 10 ⁵	1.4 X 10 ⁵	2.3 X 10 ⁵	1.35 X 10 ⁵
96	1.06 X 10 ⁶	1.14 X 10 ⁶	1.93 X 10 ⁶	1.1 X 10 ⁵	9.5 X 10 ⁴	2.3 X 10 ⁵
120	2.65 X 10 ⁶	4.73 X 10 ⁶	1.33 x10 ⁷	9.55 X 10 ⁵	7 X 10 ⁴	3.3X 10 ⁵
144	9.89 X 10 ⁶	1.022 x10 ⁷	1.39 x10 ⁷	1.35 X 10 ⁵	3 X 10 ⁴	1.95 X 10 ⁵
168	1.29x10 ⁷	1.3185x10 ⁷	1.233 x10 ⁷	6.5 X 10 ⁴	3.9 X 10 ⁵	6 X 10 ⁵
192	1.25 X 10 ⁵	7.77 X 10 ⁶	1.209 x10 ⁷	9 X 10 ³	1 X 10 ⁴	1.33X 10 ⁵
216	9.07 X 10 ⁶	3.47 X 10 ⁶	3.74 X 10 ⁶	R.E	R.E	R.E

Los datos se llevaron a unas gráficas lineales (**Fig 15** para TYI-S-33 comercial y **Fig 16** para TYI-S-33 artesanal) para apreciar mejor a qué temperatura la carga parasitaria de *Giardia lamblia* es mayor.

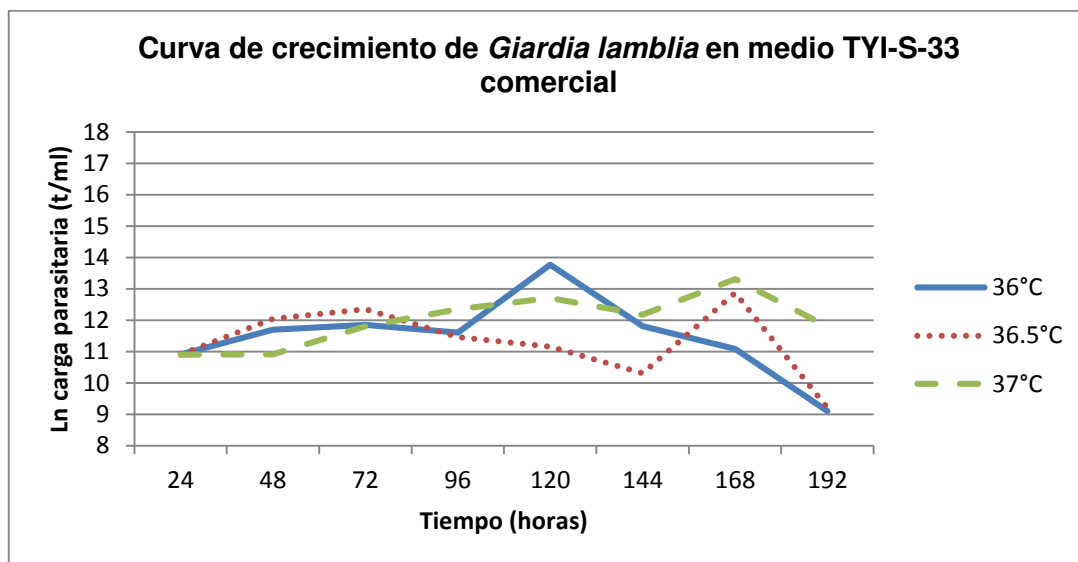


Fig 15: Curva de crecimiento en medio TYI-S-33 comercial a 36°C, 36.5°C y 37°C

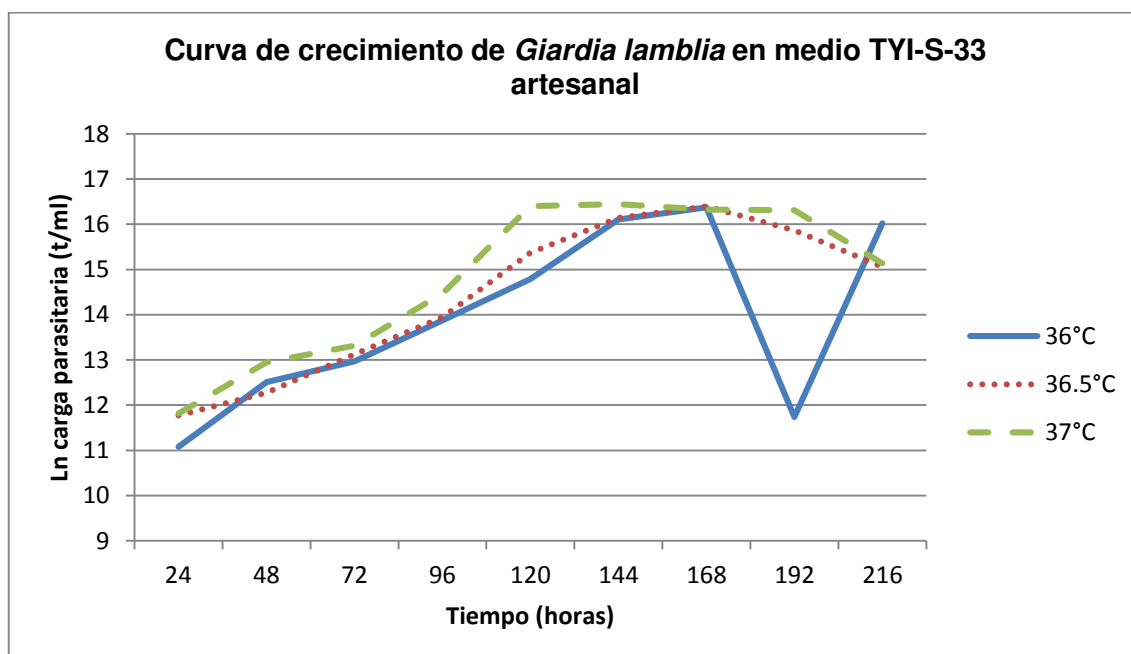


Fig 16: Curva de crecimiento en medio TYI-S-33 artesanal a 36°C, 36.5°C y 37°C

En el medio TYI-S-33 artesanal, a 37°C se observa un mayor crecimiento de *Giardia* en comparación con las otras temperaturas; se puede deducir entonces que la temperatura óptima para el desarrollo del parásito en medio TYI-S-33 artesanal es de 37°C.

Se determinaron 4 fases en la curva de crecimiento a 37°C (**Fig 17**):

- **Fase Lag:** Periodo de latencia o adaptación, no hay aumento significativo de la densidad celular pero hay gran actividad metabólica, el crecimiento es asincrónico.
- **Fase Log:** Periodo de crecimiento exponencial donde se alcanza la máxima velocidad de crecimiento. Se observa desde las 72 hasta las 120 horas.
- **Fase Estacionaria:** Periodo de retardo desaparece el crecimiento exponencial, los microorganismos entran en estrés, no hay cambios significativos de la densidad celular con respecto al tiempo, existe un equilibrio entre los microorganismos vivos y muertos. Se observa desde las 120 a 192 horas.
- **Fase de muerte:** Fase en la que el equilibrio desaparece y predominan los microorganismos muertos. No hay nutrientes para el recambio y las condiciones del medio de cultivo son adversas para el crecimiento. Esto se observó a partir de las 192 horas.

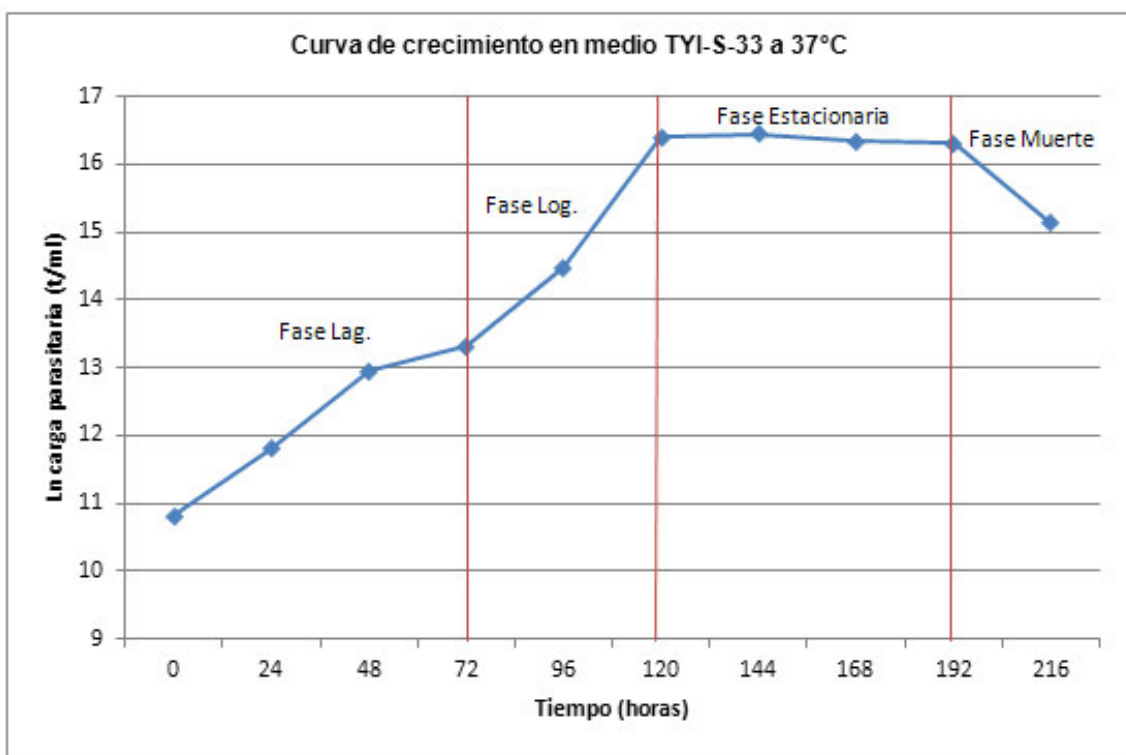


Fig 17: Fases de la curva de crecimiento en medio TYI-S-33 artesanal a 37°C

Se analizó la viabilidad de los trofozoitos de *G. lamblia* en ambos medios y se llevó a una gráfica lineal, los resultados se pueden apreciar en la **tabla 8, fig 18** para el medio TYI-S-33 comercial, y **tabla 9, fig 19** para el TYI-S-33 artesanal.

Tabla8: Viabilidad de *Giardia lamblia* en medio TYI-S-33 comercial a 36°C, 36.5°C y 37°C

HORAS	VIABILIDAD PARASITARIA (%)		
	36°C	36.5°C	37°C
24	100	100	100
48	100	100	98.07
72	98.74	95.5	92.85
96	92.54	87.5	93.14
120	86.47	76	83.6
144	88.45	84.5	75
168	77.44	77.26	79.63
192	72.2	75	64.68
216	68	65.87	58.35

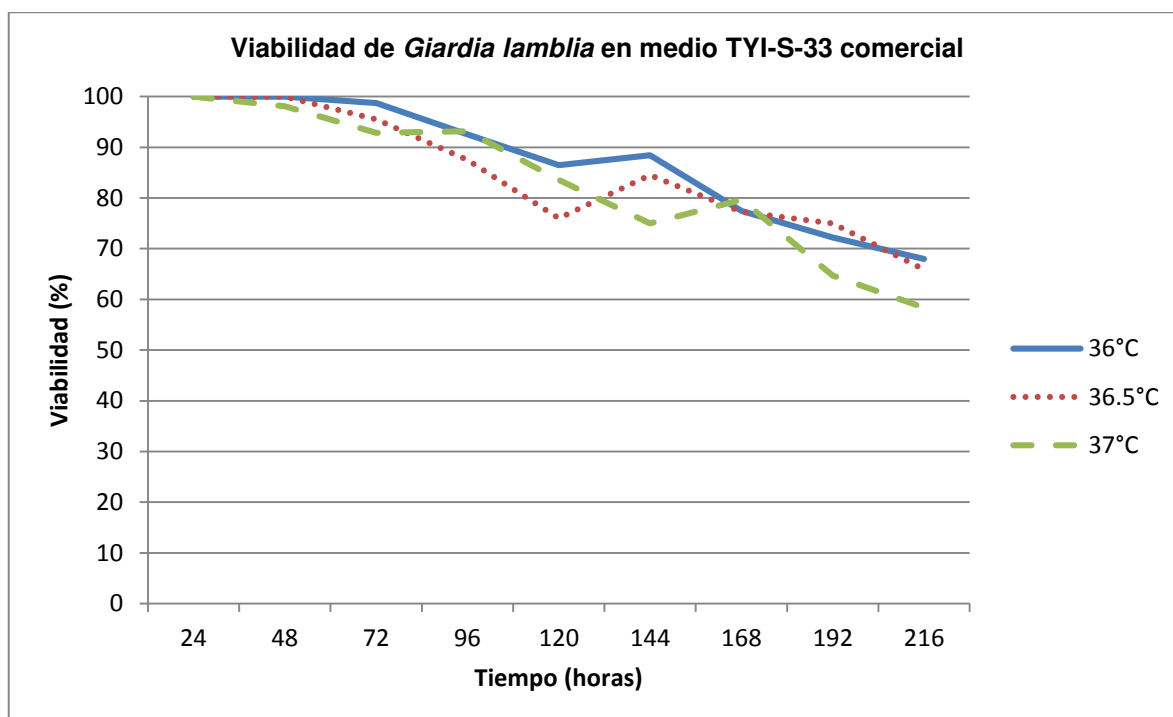


Fig 18: Curva de viabilidad de *Giardia lamblia* en medio TYI-S-33 comercial a 36°C, 36.5°C y 37°C

Tabla 9: Viabilidad de *Giardia lamblia* en medio TYI-S-33 artesanal a 36°C, 36.5°C y 37°C

HORAS	VIABILIDAD PARASITARIA (%)		
	36°C	36.5°C	37°C
24	99.82	99.82	97.46
48	98.13	98.333	96.5
72	97.847	100	97.62
96	99.92	99.85	98.36
120	98.74	98.23	97.7
144	96.73	99.27	95.93
168	94.81	99.58	98.39
192	95.23	99.76	64.02
216	95.41	97.51	60.38

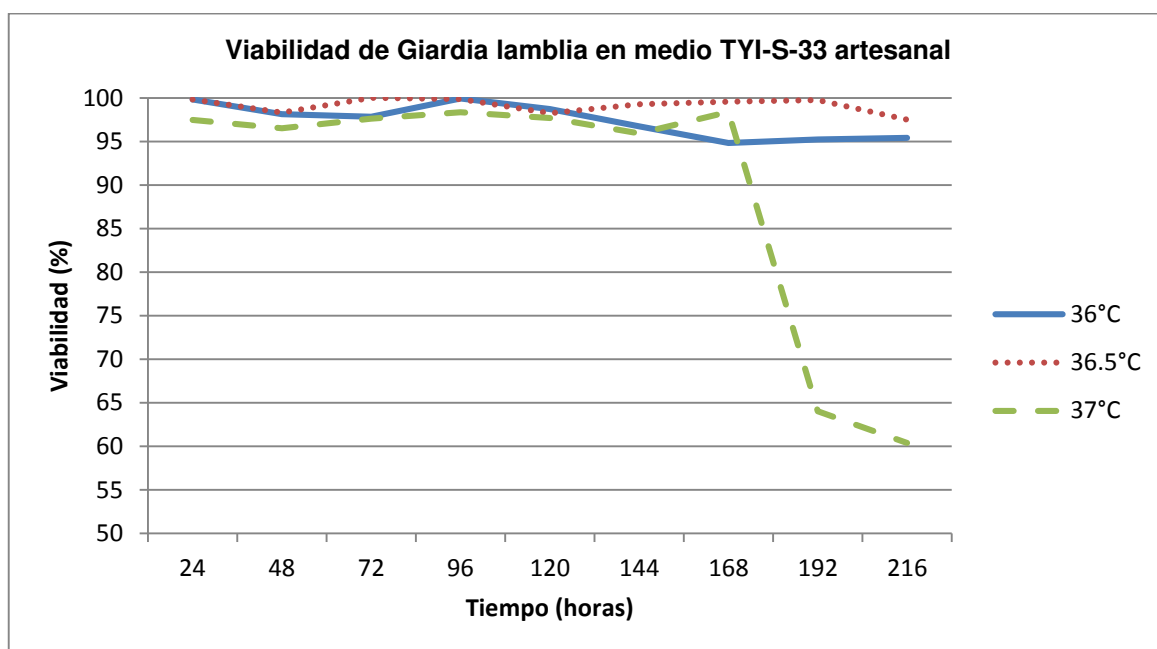


Fig 19: Curva de viabilidad de *Giardia lamblia* en medio TYI-S-33 artesanal a 36°C, 36.5°C y 37°C

Al analizar la viabilidad de los trofozoitos en el medio TYI-S-33 artesanal, se observa que al transcurrir el tiempo, la viabilidad decrece cayendo drásticamente luego de las 168 horas, cuando la temperatura de incubación es de 37°C.

Con los datos de la **tabla 7** se realizó la prueba estadística TUKEY para determinar si las temperaturas en cada medio difieren significativamente entre si obteniendo los siguientes valores:

Con respecto al medio TYI-S-33 artesanal, las temperaturas 36°C y 36.5°C presentan un valor p de **0.795**, mayor al valor alpha de **0.05** lo que significa que las temperaturas no difieren significativamente entre sí; las temperaturas 36°C y 37°C presentan un valor p de **0.316**, mayor al valor alpha de **0.05** lo que significa que tampoco difieren significativamente entre sí; y por último, las temperaturas 36.5°C y 37°C presentan un valor p de **0.683**, mayor al valor alpha de **0.05** lo que significa que tampoco difieren

significativamente entre sí. Se deduce entonces que a esas tres temperaturas el parásito crece sin una marcada diferencia, sin embargo, la temperatura que le proporciona un mejor crecimiento es 37°C (**Tabla 10**).

Tabla 10: Prueba de TUKEY para las temperaturas en medio TYI-S-33 artesanal

TUKEY HSD/KRAMER		<i>alpha</i>		0.05					
grupo	media	n	ss	df	q crítica				
TYI-S-33 Artesanal (36°C)	234.17	8	640817.18						
TYI-S-33 Artesanal (36.5°C)	362.77	8	1080612.82						
TYI-S-33 Artesanal (37°C)	529.17	8	1578958.26						
		24	3300388.25	21	3.565				
PRUEBA Q									
Grupo 1	Grupo 2	media	std error	q-stat	inferior	superior	p valor	Media crítica	Cohen d
TYI-S-33 Artesanal (36°C)	TYI-S-33 Artesanal (36.5°C)	128.61	140.16	0.92	-371.07	628.28	0.795	499.67	0.324
TYI-S-33 Artesanal (36°C)	TYI-S-33 Artesanal (37°C)	295.01	140.16	2.10	-204.67	794.68	0.316	499.67	0.744
TYI-S-33 Artesanal (36.5°C)	TYI-S-33 Artesanal (37°C)	166.4	140.16	1.19	-333.27	666.07	0.683	499.67	0.419

Con respecto al medio TYI-S-33 comercial, las temperaturas 36°C y 36.5°C presentan un valor p de **0.937**, mayor al valor alpha de **0.05** lo que significa que las temperaturas no difieren significativamente entre sí; las temperaturas 36°C y 37°C presentan un valor p de **0.325**, mayor al valor alpha de **0.05** lo que significa que tampoco difieren significativamente entre sí; y por último, las temperaturas 36.5°C y 37°C presentan un valor p de **0.190**, mayor al valor alpha de **0.05** lo que significa que tampoco difieren significativamente entre sí. Se deduce entonces que a esas tres temperaturas el

parásito crece sin una marcada diferencia, sin embargo, la temperatura que le proporciona un mejor crecimiento es 37°C (**Tabla 11**).

Tabla 11: Prueba de TUKEY para las temperaturas en medio TYI-S-33 comercial

TUKEY HSD/KRAMER		<i>alpha</i>		<i>0.05</i>					
<i>grupo</i>	media	n	ss	df	q crítica				
<i>TYI-S-33 Comercial (36°C)</i>	19.75	8	6718						
<i>TYI-S-33 Comercial (36.5°C)</i>	13.875	8	1080.375						
<i>TYI-S-33 Comercia(37°C)</i>	44.812	8	16657.969						
		24	24456.344	21	3.565				
<i>PRUEBA Q</i>									
<i>Grupo 1</i>	Grupo 2	media	std error	q- stat	inferior	superior	p valor	Media crítica	Cohen d
<i>TYI-S-33 Comercial(36°C)</i>	TYI-S-33 Artesanal (36.5°C)	5.875	12.065	0.48 7	-37.138	48.88	0.937	43.01	0.172
<i>TYI-S-33 Comercia (36°C)</i>	TYI-S-33 Artesanal (37°C)	25.06 3	12.065	2.07 7	-17.950	68.07	0.325	43.01	0.734
<i>TYI-S-33 Comercia(36.5°C)</i>	TYI-S-33 Artesanal (37°C)	30.93 7	12.065	2.56 4	-12.075	73.95	0.190	43.01	0.906

Con estos resultados se puede demostrar que a las 3 temperaturas el parásito crece sin diferencia significativa, pero se pudo observar que a 37°C el crecimiento es un poco mayor en ambos medios por lo cual se toma a ésta temperatura como la óptima. Por último, para saber si entre ambos medios a 37°C el crecimiento de *Giardia lamblia* varía significativamente se le realizó la prueba ANOVA dando el siguiente resultado: El valor de p fue de **0.01236585**, menor al valor alpha de **0.05** lo que significa que el crecimiento del parásito en los medios TYI-S-33 artesanal y comercial a 37°C difieren significativamente entre sí (**Tabla 12**), llegando a la conclusión que el medio TYI-S-33

artesanal es un medio de cultivo donde *Giardia lamblia* se desarrolla y crece mejor que en el medio TYI-S-33 comercial.

Tabla 12: Prueba de ANOVA para la carga parasitaria en medio TYI-S-33 artesanal y TYI-S-33 comercial a 37°C

DESCRIPCION					Alpha	0.05		
Grupo	Cantidad	Suma	Media	Varianza	SS	Std Error	Inferior	Superior
TYI-S-33 Artesanal (37°C)	8	4233.4	529.175	225565.465	1578958.26	119.359011	273.175383	785.174617
TYI-S-33 Comercial (37°C)	8	358.5	44.8125	2379.70982	16657.9688	119.359011	211.187117	300.812117

ANOVA								
Fuente	SS	df	MS	F	P valor	F critica	RMSSE	Omega Sq
Entre grupos	938428.126	1	938428.126	8.23380558	0.01236585	4.60010994	1.01450761	0.31134829
Dentro de grupos	1595616.22	14	113972.587					
Total	2534044.35	15	168936.29					

Se determinó el tiempo generacional aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Tiempo generacional} = \frac{(t - t_0)}{3.3 \times \log_{10} \left(\frac{Z}{Z_0} \right)}$$

Donde:

Z: Concentración de trofozoítos después de 24 horas

Z₀: Concentración inicial de trofozoitos

t: 24 horas después de la incubación de los trofozoitos

t₀: Tiempo de inicio

A. Tiempo generacional a 37°C

- Tiempo generacional en medio TYI-S-33 artesanal:

$$Tiempo\ generacional = \frac{(24 - 0)}{3.3x \log_{10} \left(\frac{135000}{49700} \right)} = \mathbf{16.75\ horas}$$

- Tiempo generacional en medio TYI-S-33 comercial:

$$Tiempo\ generacional = \frac{(24 - 0)}{3.3x \log_{10} \left(\frac{55000}{49700} \right)} = \mathbf{165\ horas}$$

B. Tiempo generacional a 36.5°C

- Tiempo generacional en medio TYI-S-33 artesanal:

$$Tiempo\ generacional = \frac{(24 - 0)}{3.3x \log_{10} \left(\frac{130000}{49700} \right)} = \mathbf{17.42\ horas}$$

- Tiempo generacional en medio TYI-S-33 comercial:

$$Tiempo\ generacional = \frac{(24 - 0)}{3.3x \log_{10} \left(\frac{55000}{49700} \right)} = \mathbf{165\ horas}$$

C. Tiempo generacional a 36°C

- Tiempo generacional en medio TYI-S-33 artesanal:

$$Tiempo\ generacional = \frac{(24 - 0)}{3.3x \log_{10} \left(\frac{65000}{49700} \right)} = \mathbf{62.39\ horas}$$

- Tiempo generacional en medio TYI-S-33 comercial:

$$Tiempo\ generacional = \frac{(24 - 0)}{3.3x \log_{10} \left(\frac{55000}{49700} \right)} = \mathbf{165\ horas}$$

VI. DISCUSIÓN

Diversos autores han reportado el crecimiento *in vitro* de *Giardia* sp en medios de cultivo artificiales, los mismos que deben mantener factores ambientales y condiciones fisicoquímicas tales como temperatura, tiempo, pH, potencial de óxido-reducción, nutrientes entre otros, adecuados para que el parásito pueda crecer fuera de su entorno natural.

Al pasar de los años, los medios de cultivo para *Giardia* sp se han ido perfeccionando en cuanto a los nutrientes necesarios para un crecimiento óptimo del parásito. En relación a la fuente de peptona, Meyer en el año 1970 empleó un medio al cual nombró M3 que no era muy enriquecido y que no contenía una fuente de peptona, en ese medio logró cultivar trofozoitos de *Giardia* sp provenientes de un conejo, chinchilla y gato, pero cultivar trofozoitos de *Giardia lamblia* es un proceso que implica un medio de cultivo enriquecido; por ello, en 1976 emplea la peptona phytona (BBL) como constituyente del medio HSP-1 y HSP-2 obteniendo en un inicio resultados satisfactorios que luego evidenciaron una falla en el crecimiento; en 1980, Visvesvara empleó el PANMEDE (papaína de hígado de buey) en el medio TPS-1 usado inicialmente para el cultivo de *Entamoeba histolytica* obteniendo resultados satisfactorios, pero tuvo la limitante de abastecimiento del insumo; posteriormente en 1978 Diamond sustituyó este constituyente por tripticasa y extracto de levadura, creando así el medio TYI-S-33 que fue usado por Kesiter en 1983, de aquí en adelante las investigaciones mantienen a estas fuentes de peptona como constituyentes del medio TYI-S-33.

Otro de los nutrientes requeridos para el crecimiento de *Giardia* sp es la bilis. Diamond en 1978 obvió el uso de ésta en su medio TYI-S-33 ya que su objetivo era el de cultivar *Entamoeba histolytica*; pero Farthing *et al* en 1983 reportó la necesidad del uso de bilis en el medio para cultivar *Giardia* sp. ya que este parásito es incapaz de

sintetizar fosfolípidos de su membrana, y en su ausencia logra un rendimiento del 17%.

En 1988 Kaneda y Goutsu indicaron que *Giardia* sp tiene como principales fosfolípidos a la fosfatidil colina, fosfatidiletanolamina y esfingomielina, como lípidos neutros a los esteroides y como ácidos grasos a los ácidos palmítico y oleico; estos lípidos se encuentran presentes en el suero y bilis bovina, ahí la importancia de su uso en la preparación del medio de cultivo TYI-S-33.

Autores que han reportado el crecimiento de *Giardia* sp han cultivado al parásito a temperaturas que van desde los 35°C hasta los 37.5°C. Gillin y Reiner en 1982 cultivaron trofozoitos de *Giardia* a 35.5 °C ± 0.5 °C durante 24 a 72 horas logrando un crecimiento exitoso. Keister en 1983 cultivó a 36°C durante 72 a 96 horas logrando una carga parasitaria de 10⁴ a 10⁵ trofozoitos/ml. Isaac *et al* en 1992 cultivaron al parásito a 37°C, Rosales-Borja *et al.* (2009) lo cultivaron a la misma temperatura durante 72 horas obteniendo una carga parasitaria de 10⁶ trofozoitos/ml, Condo *et al.* (2016) también cultivaron *Giardia* a 37°C durante 72 horas logrando una carga parasitaria de 10⁵ trofozoitos/ml. Boucher y Gillin en 1990, cultivaron al parásito a 37.5°C durante 72 horas obteniendo una carga parasitaria de 10⁵ trofozoitos/ml. Estas temperaturas concuerdan con los ensayos realizados en este trabajo ya que se demostró que a temperaturas entre 36°C y 37°C *Giardia lamblia* crece sin mayores complicaciones encontrándose que 37°C es la temperatura donde alcanza un mayor crecimiento y rendimiento, teniendo en cuenta también que 37°C es la temperatura corporal del hombre.

El cultivo TYI-S-33 es muy rico en nutrientes por ello es necesario agregarle ciertos antibióticos para evitar la contaminación bacteriana. Meyer en 1976 agregó a sus medios de cultivo una combinación de penicilina (50000 U) y estreptomicina (0.05 g), Boucher y Guillin en 1990 agregaron a su medio penicilina (500ug/ml) y amikacina

(125 ug/ml), Rezaian y Ghalhari en 1995 añadieron a sus cultivos penicilina (400 U/ml), estreptomina (500 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y amikacina (125 µg/ml); Hernández *et al* en el 2002 utilizaron penicilina (100 U/ml) y estreptomina (0.1 mg/ml). Son varios los antibióticos y concentraciones utilizados por estos autores y en este trabajo se realizaron ensayos para encontrar los antibióticos y concentración adecuados que aseguren un cultivo axénico, teniendo como resultado lo siguiente: penicilina (688 U/ml), estreptomina (688 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y amikacina (156 µg/ml).

Se realizó la curva de crecimiento para determinar los días de incubación necesarios para obtener a la cepa ATCC 30957 en buenas condiciones fisiológicas. Con las curvas de crecimiento desarrolladas se pudo determinar el tiempo generacional que fue de 16.75 horas con un inóculo de siembra de 4.97×10^4 trofozoitos/ml con una viabilidad del 98.68%, alcanzando una carga máxima de 1.39×10^7 trofozoitos/ml a las 144 horas de incubación, con una viabilidad superior al 95%. Farthing *et al* reportaron un tiempo generacional para Giardia sp de 12 ± 1.1 horas y Visvesvara reportó un tiempo generacional de 12.2 horas. Lu *et al* en el año 1990 reportaron un tiempo generacional de 15 ± 2 horas.

Así como lo reportan los autores mencionados anteriormente, con un inóculo de 10^5 trofozoitos/ml a las 72 horas el parásito alcanza su fase logarítmica de crecimiento, tiempo en el cual se realiza la resiembra en un medio nuevo y asegura una alta carga parasitaria en las mejores condiciones fisiológicas

Después de 9 días de incubación pudo observarse la presencia de aglutinación de trofozoitos en rosetas, de 4 a 5 organismos y la disminución de viabilidad de hasta 60%, corroborado por la tinción azul de las células muertas al emplear el medio de exclusión con el colorante vital azul de tripán; sin embargo, no se observó lo reportado por Visvervara (2002), quien indica la formación de anillos asociadas a muerte celular.

En general, el metabolismo energético de los parásitos anaerobios es semejante al del resto de los eucariontes, donde con la glucólisis se utiliza la glucosa, es por ello que su metabolismo energético es del tipo “fermentador”, a través de la vía clásica de la glucólisis. Por lo tanto, la principal fuente de energía de los protozoos es la glucosa y sus oligómeros y polímeros (Werner, 2014). Esta afirmación concuerda con los resultados obtenidos donde se aprecia que el cultivo TYI-S-33 artesanal que contiene 10% de glucosa tiene un mayor rendimiento en el crecimiento de *G. lamblia* en comparación con el medio TYI-S-33 comercial que no contiene glucosa en sus constituyentes.

Después de revisar la literatura y nuestros resultados se concluye que los principales componentes del medio TYI-S-33 es un digerido pancreático de caseína, denominado tripticasa, la bilis y el suero bovino; componentes que aportan diferentes nutrientes como factores de crecimiento, vitaminas, cofactores de enzimas, proteínas, lípidos, hormonas y sales minerales, entre otros. Asimismo que es necesario el uso de soluciones antimicrobianas para disminuir y/o eliminar la contaminación bacteriana.

VII. CONCLUSIONES

- El medio de cultivo TYI-S-33 artesanal, que contiene glucosa al 10%, fue mejor para el crecimiento de trofozoítos de *Giardia lamblia* con respecto al medio TYI-S-33 ATCC 2695 comercial que carece de glucosa.
- La adición de antibióticos al medio como: penicilina (394 U/ml), estreptomicina (394 µg/ml), gentamicina (50 µg/ml) y amikacina (156 µg/ml) es importante para evitar la contaminación microbiana.
- La temperatura óptima de crecimiento es de 37°C, y el tiempo en que alcanza la fase logarítmica de crecimiento es de 72 a 120 horas con una viabilidad promedio del 97.7%.
- El menor tiempo generacional determinado fue de 16.75 horas a 37°C en medio TYI-S-33 artesanal.

VIII. RECOMENDACIONES

- Debido a que el medio TYI-S-33 es muy rico en nutrientes y fácilmente contaminable, es fundamental trabajar en cabina de flujo laminar y con todos los implementos estériles.
- La resiembra de los cultivos debe de realizarse entre las 72 y 96 horas para evitar la muerte de los trofozoitos por la falta de nutrientes.
- El medio TYI-S-33 se debe almacenar a 4°C durante un máximo de 10 días ya que la efectividad de algunos insumos tiende a disminuir con el tiempo.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACKERS, J. Giardiasis: basic parasitology. Trans. Royal. Soc. Of Trp. Med. And Hygiene. 1980; 74(4): 427-429.
- ADAM R. Biology of *Giardia lamblia*. Clin Microbiol Rev. 2001; 14(3): 447-475.
- ALI S, MARTIN D, MONZOTE A & FONTE L. Giardiasis extraintestinal: entre realidades y mitos. Rev Haban Cienc Méd. 2008; 7(2).
- ALPARO I. Giardiasis y desnutrición. Rev Bol Ped. 2005; 44(3): 166-173
- BANCES F, RODRÍGUEZ D, ALBUQUERQUE P & PAZ A. Eficacia y seguridad de Nitazoxanida comparada con Albendazol en el tratamiento de Giardiasis sintomática en niños de Trujillo, Perú 2008 – 2009. Rev Cient Cienc Méd. 2013; 16(1): 6-11.
- BOREHAM P, UPCROFT J & UPCROFT P. Changing approaches to the study of *Giardia* epidemiology: 1681-2000. Int J Parasitol. 1990; 20(4): 479-487.
- BOUCHER S & GILLIN F. Excystation of *In Vitro*-Derived *Giardia lamblia* Cysts. Infect Immun. 1990; 58(11): 3516-3522.
- CARDONA E, CASTAÑEDA S, ÁLVAREZ M, PÉREZ J, RIVERA F & LÓPEZ G. Comparación de métodos convencionales y moleculares para la detección de *giardia lamblia* en heces humanas. Revista luna azul. 2014; 38: 159-170.
- CHACÓN N & JIMÉNEZ J. Giardiasis como causa de Diarrea en el Viajero. Ant e Inf. 2010; 16(1-4): 15-24.
- CONDO C, SALAMANCA E, TICONA J, MONZÓN J, FLORES N, UDAETA E, SERRATO A, MARUPA N & GIMÉNEZ A. Evaluación de la susceptibilidad *in vitro* sobre trofozoitos de *Giardia lamblia* frente a extractos de plantas de la Medicina Tradicional Tacana. Revista Con-Ciencia. 2016; 4(1): 105-112.

- COUTINHO J. Contribution to the study of *Giardia lamblia* Stiles, 1915. Arq Hig Saude Publica. 1960; 35: 273-82.
- DIAMOND L, HARROL D & CUNNICK C. A new médium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1978; 72(4): 431-432.
- DÍAZ J & FERNÁNDEZ M. Giardiasis: Una breve revisión. Perspectivas diagnósticas en el laboratorio clínico. An Esp Pediatr. 1996; 44: 87-91.
- FARTHING M, VARON S & KEUSCH G. Mammalian bible promotes growth of *Giardia lamblia* in axenic culture. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983; 77(4): 467-469.
- GUERRA M. Ensayos farmacológicos *in vitro* para evaluar actividad anti giardiásica. Rev Cubana Farm 2001; 35(1): 66-73.
- GILLIN F & REINER D. Attachment of the Flagellate *Giardia lamblia*: Role of Reducing Agents, Serum, Temperature, and Ionic Composition. Mol Cell Biol. 1982; 2(4): 369-377.
- HERNÁNDEZ P, CALDAS M & WASSERMAN M. Enquistación *in vitro* de *Giardia lamblia*: análisis por electroforesis bidimensional de proteínas expresadas diferencialmente. Biomédica. 2002; 22: 253-62.
- HERNÁNDEZ P, CHAPARRO J, VELANDIA M, ÁLVAREZ W & PÉREZ P. Muerte celular programada en protozoarios: el caso de *Giardia intestinalis*. Rev salud bosque. 2012; 2(1): 25-33.
- ISAAC-RENTON J, SHAHRIARI H & BOWIE W. Comparison of an *In Vitro* Method and an In Vivo Method of *Giardia* Excystation. Appl Environ Microbiol. 1992; 58(5): 1530-1533.
- IVANOV, A. *Giardia* and giardiasis. Bulg Jour Vet Med. 2010; 13(2): 65-80.

- KANEDA Y & GOUTSU T. Lipid analysis of *Giardia lamblia* and its culture medium. Ann Trop. Med Parasitol. 1988; 82(1): 83-90.
- KARAPETYAN A. *In vitro* cultivation of *Giardia duodenalis*. J Parasitol. 1962; 48(3): 337-340.
- KEISTER D. Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1983; 77(4): 487-488.
- LU S, WANG Z & ZHU H. Establishment of an axenic culture of *Giardia lamblia* through preliminary passage in suckling gerbil. Chin Med J (Engl). 1990; 103(7): 583-587.
- LUCERO-GARZÓN T, ÁLVAREZ-MOTTA LA, CHICUE-LÓPEZ JF, LÓPEZ-ZAPATA D & MENDOZA-BERGAÑO CA. Parasitosis intestinal y factores de riesgo en niños de los asentamientos subnormales, Florencia-Caquetá, Colombia. Rev Fac Nac Salud Pública. 2015; 33(2): 171-180. DOI: 10.17533/udea.rfnsp.v33n2a04.
- LUJAN H. *Giardia* y giardiasis. Medicina (Buenos Aires). 2006; 66(1): 70-74
- MARCOS L, MACO V, TERASHIMA A, SAMALVIDES F & GOTUZZO E. Prevalencia de parasitosis intestinal en niños del valle del Mantaro, Jauja, Perú. Rev Med Hered. 2002; 13(3): 85-90. DOI: DOI: 10.20453/rmh.v13i3.695
- MARTINEZ E, CERPA L & LIU M. Prevalencia de giardiasis en guarderías infantiles de Tiabaya-Arequipa, Perú 2006. Neotrop. Helminthol. 2011; 5(2): 257-264.
- MEYER E. *Giardia lamblia*: Isolation and axenic cultivation. Exp Parasitol. 1976; 39:101-105.
- MEYER E. Isolation and axenic cultivation of *Giardia* trophozoites from the rabbit, chinchilla and cat. Exp. Parasitol. 1970; 27: 179-183.

- MEYER E & POPE B. Culture *in vitro* of *Giardia* trophozoites from the rabbit and chinchilla. Nature. 1965; 207: 1417-1418
- NISHAT H. Cultivation of parasites. Trop Parasitol. 2014; 4(2): 80-89. DOI: 10.4103/2229-5070.138534.
- NÚÑEZ F, LÓPEZ J, DE LA CRUZ A & FINLAY. Factores de riesgo de la infección por *Giardia lamblia* en niños de guarderías infantiles de Ciudad de La Habana, Cuba. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. 2003; 19(2): 677-682.
- RIVERA M, DE LA PARTE MA, HURTADO P, MAGALDI L & COLLAZO M. Giardiasis Intestinal. Mini-revisión. Invest Clín. 2002; 43(2): 119-128.
- RODRIGUEZ C. Prevalencia de giardiosis y algunos factores de riesgo en niños del área rural del distrito de los Baños del Inca, Cajamarca – Perú. Rec Fac Cien Med. 2012; 37(1-2): 17-23
- ROSALES D, DÍAZ J, DOÑA A, MASCARO C, OSUNA A & ORTIZ L. Medio de Keister modificado para el cultivo de *Giardia lamblia in vitro*. Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA. 2009; 3(1):35-37.
- SHEFFIELD H & BJORVAT B. Ultrastructure of the cyst of *Giardia lamblia*. Am J Trop Med Hyg. 1977; 26(1): 23-30.
- THOMPSON A. Giardiasis: Conceptos modernos sobre su control y tratamiento. Ann Nestlé. 2008; 66: 23–29. DOI: 10.1159/000151270
- THOMPSON A. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. Vet Parasitol. 2004: 15-35. DOI:10.1016/j.vetpar.2004.09.008.
- TORRES G, ZAPATA M, RESTREPO M & RÍOS L. Scientific research about genotyping and distribution of *Giardia intestinalis* in humans and dogs from America. Rev Científic Salud Uninorte. 2011; 27(1): 49-62.

- VÁZQUEZ O, & CAMPOS T. Giardiasis: La parasitosis más frecuente a nivel mundial. Revista del Centro de Investigación, Universidad La Salle. 2009; 8(3-1): 75-90.
- VISVESVARA G. Axenic growth of *Giardia lamblia* in Diamond's TPS-1 medium. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1980; 74(2): 213-215.
- VISVESVARA G & GARCIA L. Culture of Protozoan Parasites. Clin. Microbiol. Rev. 2002; 15(3): 327–328.
- WERNER L. Parasitología humana. ISBN 1456235044, 9781456235048

X. ANEXO

ANEXO 1

CICLO DE VIDA DE *Giardia lamblia*

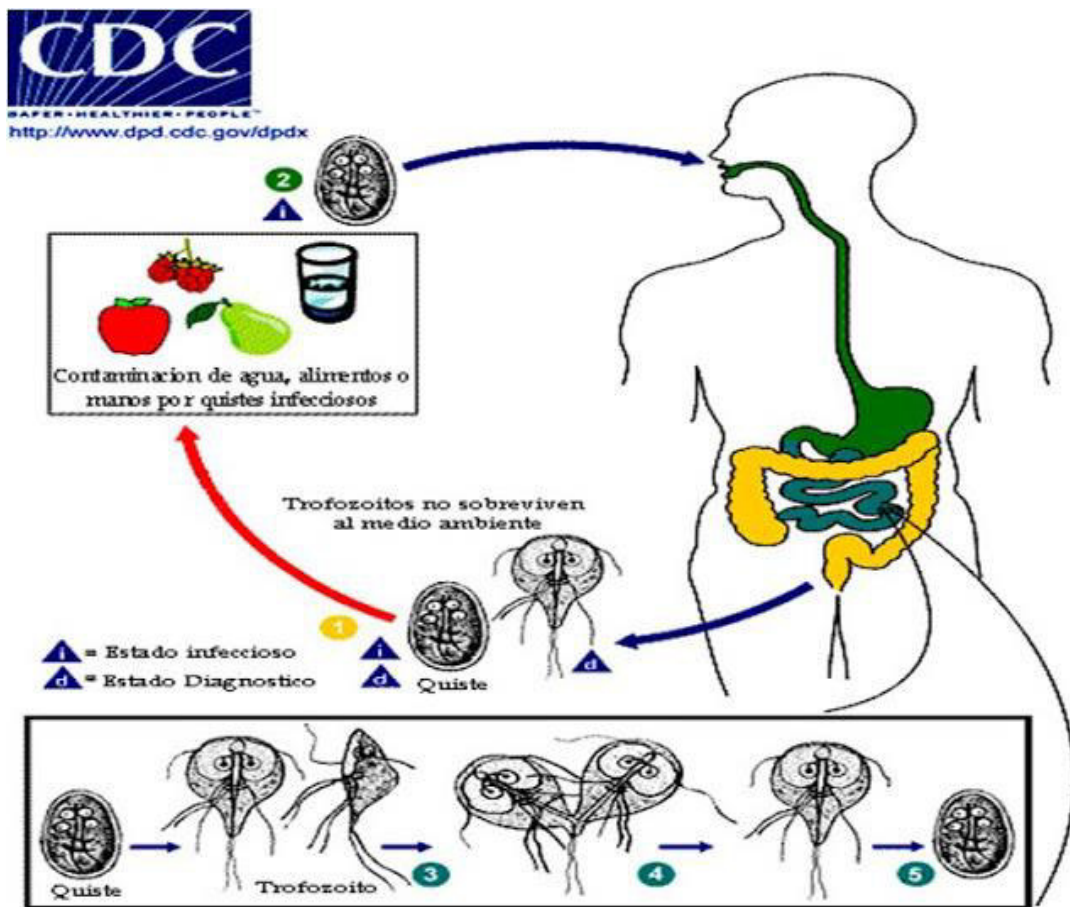


Fig 20: Ciclo de vida de *Giardia lamblia*

1. Los quistes en el medio ambiente contaminan el agua y alimentos
2. Los quistes son ingeridos accidentalmente con el agua y los alimentos
3. Los trofozoitos son liberados por acción de los jugos gástricos.
4. Se multiplican por fisión binaria en el duodeno y yeyuno
5. Si las condiciones del medio son desfavorables, los trofozoitos se enquistan y salen al exterior junto con las heces.

Fuente: CDC